

Aus der Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Immunstatus bei Kindern mit cALL unter Erhaltungstherapie:
Immunologische Marker und Proliferationsvergleich mit nicht-onkologischen Patienten

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians Universität zu München

vorgelegt von
Felix Rockmann
aus
Aschaffenburg
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. D. Reinhardt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. T. Haferlach

Prof. Dr. R. Hart

Mitbetreuung durch
den promovierten

Mitarbeiter: Dr. med. D. Stachel

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2003

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1. Einleitung.....	5
2. Patienten, Material und Methoden.....	7
2.1. <i>Patienten</i>	7
2.2. <i>Material</i>	9
2.2.1. Materialgewinnung onkologische Patienten	9
2.2.2. Materialgewinnung Kontrollgruppe.....	9
2.3. <i>Methoden</i>	10
2.3.1. Antikörpermarkierung und Messung	10
2.3.2. Verwendete Antikörperkombinationen.....	10
2.3.3. Proliferation in der Mixed Lymphocyte Culture (MLC)	13
2.3.4. FACS-Untersuchungen vor MLC	16
2.3.5. Cell-Proliferation-ELISA	16
2.3.6. Cell-Death-Detection-ELISA.....	17
2.3.7. Untersuchungen nach MLC.....	18
2.3.8. Nachweis der mRNA verschiedener Zytokine mittels rT-PCR.....	19
2.3.9. Auswertung und statistische Analyse	20
2.4. <i>Vorversuche und Kontrollen</i>	21
2.4.1. Proliferation-Detection-ELISA (BrdU-Test)	21
2.4.2. Apoptose-ELISA.....	22
2.4.3. Testimmanente Kontrollen.....	24
3. Ergebnisse.....	25
3.1. <i>Ergebnisse der phänotypischen Untersuchungen mittels Fluoreszenz activated cell sorting (FACS)</i>	25
3.1.1. Verteilung der phänomorphologischen Merkmale auf PMNC bei Kindern mit ALL in der Dauertherapie	25
3.1.2. Charakterisierung der PMNC unter Dauertherapie einzelner Patienten .	32

3.1.3.	Charakterisierung der bei Diagnosestellung gewonnenen ALL-Blasten.	50
3.1.4.	Charakterisierung der in der MLC eingesetzten PNMC nach der MLC ..	50
3.1.5.	Ergebnisse und Auswertung der Proliferationsuntersuchungen in der MLC von MNC mit autologen und allogenen ALL-Zellen	53
3.1.6.	Ergebnisse und Auswertung der Apoptose-Untersuchungen nach der MLC von MNC mit autologen und allogenen ALL-Zellen mit dem Cell-Death-Detection-ELISA	55
3.1.7.	rT-PCR nach MLC aus der MLC von MNC der Patienten mit autologen ALL-Zellen als Stimulatoren	57
3.2.	Korrelationen.....	58
4.	Diskussion	63
4.1.	Einordnung der phänotypischen Untersuchungen von Oberflächenmarkern von PMNC's in der Dauertherapie.....	63
4.2.	Interpretation der Proliferationsuntersuchungen in der MLC in Zusammenhang mit den FACS-Untersuchungen.....	68
4.3.	Interpretation der CDD-ELISA-Ergebnisse post-MLC auch in Bezug auf die phänotypischen FACS-Untersuchungen.....	69
4.4.	Interpretation und Einordnung der rT-PCR-Ergebnisse.....	71
5.	Zusammenfassung	73
6.	Anhang.....	75
6.1.	Tabellen.....	75
6.2.	Verwendete Abkürzungen	80
6.3.	Abbildungsverzeichnis.....	81
6.4.	Tabellenverzeichnis.....	83
6.5.	Lebenslauf.....	86
6.6.	Danksagung.....	87
6.7.	Literaturverzeichnis:.....	88

1. Einleitung

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) im Kindesalter ist in den letzten Jahrzehnten eine gut behandelbare Erkrankung geworden. Lag noch im Jahre 1960 die 5-Jahres-Überlebensrate der Kinder mit ALL bei nur 5%, so ergeben sich heute durch verbesserte Therapieverfahren, insbesondere durch die kombinierte Radio-Chemotherapie, Überlebensraten von bis zu 80% [60]. Wesentliche Fortschritte waren dabei die Kontrolle des leukämischen Befalls des ZNS, die Verminderung der Toxizität der systemischen Chemotherapie und der frühere Einsatz spezieller alternierender Therapieverfahren [92]. In den letzten Jahren konnten jedoch in Bezug auf das Langzeitüberleben keine entscheidenden Verbesserungen mehr erzielt werden. Parallel zu der Erforschung optimaler Behandlungsmöglichkeiten von akuten lymphatischen Leukämien war immer auch ein Ziel, bei der Suche nach möglichen immunologischen Ursachen, nach chromosomalen Aberrationen [93] und weiteren Parametern erfolgreich zu sein, um ein besseres Verständnis für die Ätiologie der Erkrankung zu erlangen. Da in vielen Studien (Übersicht siehe [33] und [63]) gezeigt werden konnte, dass die Radiochemotherapie alleine nicht zu einem vollständigen Verschwinden aller leukämischen Zellen führt, was als Minimal Residual Disease (MRD) bezeichnet wird, stellte sich die Frage, warum nicht alle Patienten nach Beendigung der Therapie ein Rezidiv erleiden.

Bei den weiterführenden Untersuchungen interessierten vor allem die unterschiedlichen Subtypen der Lymphozyten. Bei der Charakterisierung der unterschiedlichen Subtypen kommt vor allem das Verfahren des „Fluorescence-activated cell sorting“ (FACS) zum Einsatz [8, 84]. In dieser Arbeit wurden die FACS-Untersuchungen vor allem zur Beleuchtung folgender Fragen genutzt:

Gibt es Unterschiede in der Aktivität des Immunsystems während der Dauertherapie ?

Welche Parameter könnten dabei von Bedeutung sein [30] ?

Inwieweit ist immunologische Toleranz hier ein Einflussfaktor [39] ?

Mittels verschiedener Methoden wurde unter diesem Blickwinkel bei Kindern mit ALL eine Momentaufnahme des Status von Immunzellen am Ende der Erhaltungstherapie erstellt und ein breites Spektrum an laborchemischen Parametern erfasst, um für weiterfolgende Untersuchungen geeignete Parameter herauszufiltern.

Im Einzelnen wurde eine phänotypische Untersuchung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut von ALL-Patienten durchgeführt, insbesondere wurde hierbei die Expression von Aktivierungs- sowie Reifungsantigenen von T-, B- und NK-Zellen untersucht. Ergebnisse hierüber sollten Aussagen über eine homogene bzw. unterschiedliche Expression bestimmter Antigene ermöglichen. Anschließend wurden diese mit den Ergebnissen aus den Proliferationsversuchen korreliert. Die Untersuchung der bei Diagnosestellung gewonnenen ALL-Zellen sollte weiterhin die phänotypische Verteilung interessanter Apoptose-vermittelnder Oberflächenantigene zeigen. Eine in-vitro-Relevanz dieser Ergebnisse wurde mit den Apoptose-ELISA's der Mixed Lymphocyte Culture (MLC) belegt. Auf Einzelzellebene wurde mit Hilfe von FACS-Untersuchungen der Nachweis tatsächlich apoptotischer Zellen dieser MLC-Experimente geführt. Um während der MLC gebildete ausgewählte Zytokine zu erfassen, wurde nach der MLC eine PCR der mRNA einiger bekannter Aktivierungszytokine angeschlossen.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Patienten

Die Patientengruppe (n=13) bildeten Kinder mit akuter lymphatischer Leukämie vom cALL-Typ. Die Kontrollgruppe (n=13) bestand aus Kindern der chirurgischen oder pädiatrischen Ambulanz, die entweder zu elektiven chirurgischen Eingriffen waren oder zu Kontrolluntersuchungen in der pädiatrischen Ambulanz vorstellig wurden. Keines der Kontrollkinder litt zur Zeit der Blutabnahme an einer Infektion oder wurde bis Ende der Studie wegen einer hämatologischen/ onkologischen Erkrankung behandelt. Es folgt die genauere Beschreibung der Gruppe 1, die onkologischen Patienten (vgl. Tabelle 2.1): der Mittelwert (+/-StdAbw) des Alters bei Diagnose war zum Zeitpunkt der Blutabnahme 5,0 (+/-2,9) Jahre, die Blutabnahmen erfolgten im Mittel(+/-StdAbw) 222 (+/-61), 233 (+/-61) und 244 (+/-64) Tage nach Diagnosestellung. Das Körpergewicht betrug zur Zeit der Blutabnahmen im Mittel 20,2 (+/-8,0) kg.

Nr.	Name	Alter in Jahren bei Diagnose	KG zum Zeitpunkt der Blutabnahme	1.Blutabnahme (Tage nach Diagnose)	2.Blutabnahme (Tage nach Diagnose)	3.Blutabnahme (Tage nach Diagnose)
1	M.M.	10,8	n.b.	324	327	349
2	M.H.	3,4	n.b.	308	328	324
3	E.S.	2,5	20,4	195	252	255
4	S.Z.	7,1	23,6	243	246	272
5	F.C.	10,6	38,7	197	205	221
6	A.W.	4,4	n.b.	158	179	n.b.
7	H.D.	2,8	13,5	200	206	291
8	M.K.	3,8	14,7	85	92	92
9	F.B.	3,8	n.b.	164	164	202
10	J.S.	1,6	12,5	239	267	267
11	E.S.	4,6	16,0	223	237	251
12	J.P.	7,2	22,5	232	253	253
13	R.K.	2,4	n.b.	233	253	253
Mittelwert		5,0	20,2	222	233	244
Median		3,8	18,2	232	246	253
Standardabweichung		2,9	8,0	61	61	64

Tabelle 2.1 : Patientengruppe: Alter, Gewicht und Zeitpunkt der Blutabnahme, n.b. nicht bekannt

Infektionen waren zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten sowohl klinisch, als auch laborparametrisch (CRP max. 1,6 mg/dl, normal bis 1,5 mg/dl) nicht vorhanden. Der CMV-Status zum Zeitpunkt der Blutabnahmen war negativ, bis auf einen positiven IgG Titer bei Patient 5 (1:2400).

Zum Zeitpunkt der Blutabnahmen war die jeweils letzte Chemotherapie vor mindestens 21 Tagen durchgeführt worden. Alle Patienten wurden nach dem COALL-92 Schema [38] behandelt und befanden sich zum Zeitpunkt der Studie in der Erhaltungstherapiephase mit 6-Thioguanin bzw. 6-Mercaptopurin. Patient 5 erhielt bei der ersten Blutabnahme G-CSF (Neupogen®). Die Patienten waren im Zeitraum der Blutabnahmen weder leukopenisch noch mit Blutprodukten substituierungspflichtig.

Die Kontrollgruppe bestand aus Patienten der Ambulanzen. Der Mittelwert (+/-StdAbw) des Alters betrug 5,7 (+/-3,4) Jahre, das Körpergewicht 22,6 (+/-9,5) kg. Die Kinder zeigten in der körperlichen Untersuchung keine klinischen Infektionszeichen, das CRP war, soweit bestimmt, negativ (vgl. Tabelle 2.2), die Werte bzgl. Alter und Körpergewicht waren nicht signifikant unterschiedlich zur Patientengruppe.

Nr	Name	Alter bei Abnahme (Jahre)	KG [kg]	CRP [mg/dl]
1	B.H.	1,2	8,0	1,0
2	B.H.	1,2	8,0	1,0
3	M.K.	13,0	35,3	1,0
4	A.H.	6,0	17,0	n.b.
5	K.S.	2,9	12,0	n.b.
6	N.N.	8,6	25,3	n.b.
7	N.N.	7,3	24,5	n.b.
8	A.C.	2,7	26,1	1,6
9	N.M.	4,5	n.b.	n.b.
10	F.R.	7,5	27,3	1,0
11	F.K.	4,7	22,0	1,0
12	D.P.	6,0	30,4	1,0
13	T.B.	8,8	35,1	1,0
Mittelwert		5,7	22,6	1,1
Median		6,0	24,9	1,0
Standardabweichung		3,4	9,5	0,2

Tabelle 2.2: Kontrollgruppe: Alter, Körpergewicht und Leukozyten, n.b.: nicht bekannt

2.2. Material

2.2.1. Materialgewinnung onkologische Patienten

Bei den onkologischen Patienten wurden heparinisierte Blutproben aus den bei diesen Patienten üblichen zentralvenösen Kathetern (Hickman-Katheter) abgenommen. Die mononukleären Zellen wurden sofort nach Abnahme durch Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Hypaque nach [11]) gewonnen und zweimal in PBS¹ bei 400g gewaschen (Verfahren s. Tabelle 6.2). Anschließend erfolgte eine Aufschwemmung in 1,0 ml RPMI² mit 15%FCS³ und Auszählung der Zellen in der Neubauer- Zählkammer. Je nach nachfolgender Bestimmung wurden die Zellen entweder auf Eis bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert oder sofort mit Antikörpern markiert und gemessen. Die verwendeten Tumorzellen der entsprechenden Patienten waren bei Diagnosestellung durch eine Knochenmarkspunktion gewonnen, nach dem obigen Prinzip separiert und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -178°C gelagert worden.

2.2.2. Materialgewinnung Kontrollgruppe

Bei allen Kindern der Kontrollgruppe wurde nach Aufklärung und Zustimmung der Eltern im Rahmen einer aus medizinischen Gründen indizierten Blutabnahme zusätzlich 2-3 ml venöses heparinisiertes Blut entnommen und identisch (vgl. Kapitel 2.2.1) separiert. Die Proben wurden ebenfalls in RPMI mit 15%FCS auf Eis bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

¹ **PBS** der Universitätsapotheke:

Natriumchlorid 8,0 g

Kaliumchlorid 0,2 g

Dinatriumhydrogenphosphatdihydrid 1,15 g

Kaliumhydrogenphosphat 0,2 g

Wasser für Injektionszwecke ad 1000,0 ml

²**RPMI** : RPMI 1640 + Glutamax der Fa Gibco, Kat No 61870-010

³**FCS**: Fetales Kälberserum der Fa Gibco BRL, Kat No 10106-060

2.3. Methoden

2.3.1. Antikörpermarkierung und Messung

Die separierten, ausgezählten und resuspendierten Lymphozyten wurden auf eine Zellkonzentration von 150.000 Zellen / 50µl mit RPMI und 15% FCS weiter verdünnt und jeweils in eine Vertiefung einer 96-well-Mikrotiterplatte überführt. Nach Zugabe von jeweils 10µl eines Fluoreszeinisothiocyanatkonjugat (FITC) oder Phycoerythrinkonjugat (PE) markierten Antikörpers bzw. Zugabe von 5µl eines Tri-Color (TC) markierten Antikörpers erfolgte eine 20min. Inkubation bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen zweimal bei 300g für 5min zentrifugiert und jeweils mit 200µl mit IF-Puffer⁴ 0,02% NaN₃ zur Messung resuspendiert. Die eigentliche Messung erfolgte an einem FACScan⁵, und die Auswertung auf einem Apple Quadra[®] mit Hilfe des Programmes CELLQuest[®] der Fa Becton Dickinson. Nach Setzen eines Lymphozytengates, einer Auswahl der Zellen nach deren Größe und Granularität, wurden mindestens 10.000 Zellen aufgezeichnet. Die Daten wurden lokal gespeichert und gesondert ausgewertet.

2.3.2. Verwendete Antikörperkombinationen

Das Ziel der FACS-Markierung der gewonnenen Zellen war eine genauere Charakterisierung der einzelnen Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut der Patienten und der ALL-Zellen. Insbesondere sollten die für die Aktivierung der zellvermittelten Immunantwort verantwortlichen Oberflächenstrukturen der T-Lymphozyten bzw. NK-Zellen untersucht und beschrieben werden.

Zur Differenzierung von T-Zellen wurde ein Anti-CD3-Antikörper verwendet. Eine weitere Unterteilung des Anteils von T-Helfer und T-Suppressorzellen wurde mit einer Doppelmarkerfärbung gegen CD4/CD8-Oberflächenantigene erreicht. Um eine möglichst breite Differenzierung der Oberflächenantigene zu erhalten, wurde eine Vielzahl von Antikörpern eingesetzt. Deren genaue Spezifikation findet sich in Tabelle 2.3, die gemessenen Kombinationen wurden in Tabelle 2.4 zusammengefasst.

⁴ IF-Puffer:

PBS (s.o.)

2% FCS

⁵ FACScan der Fa Becton Dickinson

	T-Lymphozytenantikörper und Spezifität
CD3	Anti-humaner CD3-Ak, Klon UCHT1 gegen die 20kDa -Kette, eine der drei konstanten Untereinheiten des CD-3 Teiles des TCR-CD3-Komplexes. Isotyp IgG1, kappa
CD4	Anti-humaner CD4-Ak, Klon MT310, gegen ein 56kDa Glykoprotein auf T-Helfer Zellen, sowie auf Monocyten/Macrophagen. Isotyp IgG1, kappa
CD8	Anti-humaner CD8-Ak, Klon 3B5, Isotyp IgG2a
CD11b (Leu15)	Anti-humaner CD11b-Ak, Klon D12, gegen die 165kDa -Untereinheit des CD11/CD18 Antigenheterodimers, Isotyp IgG2a
CD16	Anti-humaner CD16-Ak, Klon 3G8, erkennt zwei Isoformen von FcγRIII-Antigen, Isotyp IgG1
CD25	Anti-humaner CD25-Ak, Klon 2A3, gegen eine 55kDa Untereinheit des niedrig-affinen IL-2-Rezeptors, Isotyp IgG1, kappa
CD28	Anti-humaner CD28-Ak, Klon L293, gegen eine Form des 44kDa homodimerischen transmembranen Glykoprotein, Isotyp IgG1, kappa
CD30	Anti-humaner CD30-AK, Isotyp IgG1
CD40 L (=CD154)	Anti-humaner CD40L-AK, reagiert mit einem 39kDa großen Typ II Membranglykoprotein auf aktivierten T-Zellen, Klon TRAP1, IgG1 kappa
CD45 R0	Anti-humaner CD45 R0-Ak, Klon UCHL-1, gegen ein 180kDa Isoform des leucocyte common antigen(LCA), Isotyp IgG2a
CD45 RA	Anti-humaner CD45RA-Ak, Klon ALB11, markiert eine Expression des Exons A, Isotyp IgG1
CD56	Anti-humaner CD56-Ak, Klon N901 (NKH-1), gegen eine 140kDa Isoform des neuronalen Zell-Adhäsionsmoleküls (N-CAM), Isoform IgG1
CD57 (Leu7)	Anti-humaner CD57-Ak, Klon NC1, markiert ein Oligosaccharid mit sulfatierter Glucuronsäure, Isotyp IgM
CD62L	Anti-humaner CD62L-Ak, Klon SK11, gegen ein 65kDa Molekül, Isotyp IgG2a
CD69 (Leu23)	Anti-humaner CD69-Ak, Klon L78, gegen ein 60kDa Polypeptid mit 1-2 N-verbundenen Oligosacchariden, Isotyp IgG1, kappa
CD71	Anti-humaner CD71-Ak, Klon M-A712, gegen ein 95kDa Typ II-Membran-Glykoprotein, (Transferrinrezeptor) Isotyp IgG2a, kappa
CD122	Anti-humaner CD122-Ak, Klon Mik- 3, gegen die 70-75kDa Untereinheit (p75) des IL-2 Rezeptors, Isotyp IgG1, kappa
TCR- α/b	Anti-TCR α / β-Ak, Klon BMA031, markiert die monomorphe Untereinheit des T-Zell-Rezeptors / , Isotyp IgG2b
TCR- γ/d	Anti-TCR γ / δ -Ak, Klon IMMU510, markiert alle gamma/delta -T-Zellen unabhängig von der variablen Kette, Isotyp IgG2b

Tabelle 2.3 Spezifizierung der verwendeten T-Lymphozytenantikörper

Antikörperkombinationen und deren Färbung						
FITC	PE	TC		FITC	PE	TC
CD14	CD64			CD45RA	CD45R0	CD8
CD30	CD4			CD45RA	CD45R0	CD4
	HLA-A,B,C			Anti CD25	CD4	CD8
	Leu15	CD8		CD69 (Anti-Leu 23)	CD4	CD8
CD95	CD86	CD20		Anti CD71	CD4	CD8
CD3CD16/56	CD8			Anti HLA-DR	CD4	CD8
CD80	CD40	CD20		CD62 (Leu8)	CD4	CD8
CD86	CD40L	CD20		C1.7	CD8	
TCR α/β	TCRγ/δ	CD3		CD57 (Leu 7)	Anti HLA-DR	CD8
				CD4	Anti-Leu 28	CD8
					Anti HLA-DR	
				CD4	CD122 (Il-2Rez p75)	CD8

Tabelle 2.4 Untersuchte Antikörperkombinationen an peripheren mononukleären Zellen der onkologischen Patienten unter Dauertherapie

Ebenso wurden eine Reihe von B-Zell-Antigenen untersucht, insbesondere hinsichtlich des Vorhandenseins bekannter Pathways zur Aktivierung bzw. Apoptoseauslösung. Die genauen Spezifikationen dieser Antikörper sind in Tabelle 2.5 sowie in Tabelle 6.1 im Anhang aufgeführt.

	B-Lymphozytenantikörper und Spezifität
CD19	Anti-humaner CD19-Ak, IgG1
CD20	Anti-humaner CD20 Ak, IgG3
CD40	Anti-humaner CD40-Ak, reagiert mit einem 44+48 kDa glykosylierten Phosphorprotein, einem Mitglied der TNF-Familie auf reifen B-Zellen, jedoch nicht auf Plasmazellen, Klon MAB89, IgG1
CD80 (B7.1)	Anti-humaner CD80-Ak, reagiert mit einem ca. 60kDa großen transmembranen Glykoprotein auf aktivierten B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen, Klon BB1, IgM, kappa
CD86 (Fun-1, B7.2)	Anti-humaner CD86-Ak, reagiert mit einem 75kD Oberflächenmolekül auf aktivierten B-Zellen, Klon 2331 (FUN-1) reagiert mit einem anderen Epitop im gleichen Molekül wie IT2-2, IgG2b, kappa
CD86 (IT2.2, B7.2)	Anti-humaner CD86-Ak, reagiert mit einem 75kD Oberflächenmolekül auf aktivierten B-Zellen, Klon IT2.2, IgG2b, kappa
CD95 (Fas)	Anti-humaner CD95-Ak, kennzeichnet ein 40-50kDa transmembranes Glykoprotein auf CD4+, CD8+ und B-Lymphozyten sowie z.T auf Monozyten, Klon UB2, IgG1

Tabelle 2.5 Spezifizierung der verwendeten B-Lymphozytenantikörper

2.3.3. Proliferation in der Mixed Lymphocyte Culture (MLC)

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich mit einer provozierten Immunantwort in vitro. Im Besonderen sollte die Frage geklärt werden, ob ALL-Zellen, die durch Bestrahlung nicht mehr teilungsfähig sind, als Auslöser einer Proliferation von mononukleären Zellen dienen, bzw. ob sie eine Proliferation verhindern können. Hierzu wurden neben den nach obigen Verfahren separierten Lymphozyten der onkologischen Patienten, der Kontrollkinder und der bei Diagnose gewonnene ALL -Zellen der Patienten auch lymphatische Zelllinien, nämlich die Zelllinie 207 und 697 (beide [31]) eingesetzt. Diese sind beide CD10⁺/CD19⁺ und damit der ALL der Patienten vergleichbar ([25, 26, 31]), eine detaillierte Charakteristik beider Linien findet sich in Tabelle 2.6 und Tabelle 2.7.

Zelllinie 207	
Charakterisierung der Kultur	
Weiterer Name der Zelllinie	EU-2
Kulturmedium	90% RPMI mit 10% FCS
Dopplungsrate	60-70h
Virus Status	EBV ⁻
Erstbeschreiber	[31]
Klinische Charakterisierung	
Patient	10-jähriger Junge
Diagnose	cALL
Behandlungszeitpunkt	Während des 2.Rezidivs
Herkunft	Knochenmark
Jahr der Isolierung	1980
Immuntypisierung	
T-NK Zell-Marker	CD1 ⁻ , CD2 ⁻ , CD3 ⁻ , CD4 ⁻ , CD5 ⁺ , CD7 ⁻ , CD8 ⁻ , CD57 ⁺
B-Zell Marker	CD10 ⁺ , CD19 ⁺ , cyIgM ⁺ , sIg ⁻
Myelomonozytäre Marker	CD15 ⁻
Progenitor-/ Aktivierungs- / andere Marker	CD71 ⁺ , HLA-DR ⁺ , TdT ⁺
Genetische Charakterisierung	
Zytogenetischer Karyotyp	46, XY, keine chromosomalen Abnormalitäten
Einzige Genveränderung	P16INK4A Deletion, p53 Mutation
Funktionelle Charakterisierung	
Kolonien formend	In Methylzellulose
Zytochemie	ACP ⁺ , ANAE ⁻ , CAE ⁻ , MPO ⁻ , PAS ⁺
Protoonkogene	mRNA ⁺ : BAX, BCLXL, MDM2

Tabelle 2.6 Charakterisierung der lymphatischen Zelllinie 207 nach [25]

Zelllinie 697	
Charakterisierung der Kultur	
Weiterer Name der Zelllinie	EU-3
Kulturmedium	80% RPMI mit 20% FCS
Dopplungsrate	30-40h
Virus Status	EBV ⁻ , HBV ⁻ , HCV ⁻ , HHV-8 ⁻ , HIV ⁻ , HTLV-I/II ⁻
Erstbeschreiber	[31]
Klinische Charakterisierung	
Patient	12-jähriger Junge
Diagnose	null-ALL (nonT-non B ALL)
Behandlungszeitpunkt	Während des 1.Rezidivs
Herkunft	Knochenmark
Jahr der Isolierung	1979
Immuntypisierung	
T-NK Zell-Marker	CD1 ⁻ , CD2 ⁻ , CD3 ⁻ , CD4 ⁻ , CD5 ⁺ , CD7 ⁻ , CD8 ⁻ , CD57 ⁺
B-Zell Marker	CD10 ⁺ , CD19 ⁺ , cyIgM ⁺ , slg ⁻
Myelomonozytäre Marker	CD13 ⁻ , CD15 ⁺
Progenitor-/ Aktivierungs- / andere Marker	CD71 ⁺ , HLA-DR ⁺ , TdT ⁺
Genetische Charakterisierung	
Zytogenetischer Karyotyp	46(45-48)<2n> XY, t(1;19)(q23;p13) del (6)(q21)
Translokationen/Fusionsgene	T(1;19)(q23;p13)→E2A-PBX1 fusion gene
Einzige Genveränderung	p53 Mutation
Funktionelle Charakterisierung	
Kolonien formend	In Methylzellulose
Zytochemie	ACP ⁺ , ANAE ⁻ , CAE ⁻ , MPO ⁻ , PAS ⁺
Bekannte Zytokinantwort	Wachstumshemmung durch TNF-α
Protoonkogene	mRNA ⁺ : BAX, BCL2, BCLXL, MDM2

Tabelle 2.7 Charakterisierung der lymphatischen Zelllinie 697 nach [26]

Nach folgendem Verfahren wurden die Proben aufgearbeitet:

Es wurde pro Ansatz eine Blutprobe eines onkologischen Patienten und die Probe eines Kontrollkindes verwendet. Nach der Separation über Ficoll-Hypaque wurden die Zellen auf 1 ml mit RPMI + 15%FCS verdünnt und ausgezählt. Dann wurden die ALL-Zellen der Patienten (Gewinnung und Lagerung vgl. Kap.2.2) aufgetaut, zweimal mit RPMI gewaschen und anschließend ebenfalls auf 1 ml mit RPMI +15%FCS verdünnt und ausgezählt. Dann wurden jeweils folgende Proben bestrahlt: 0,33 Mio. Zellen des onkologischen Patienten, 0,54 Mio. Zellen des Kontrollkindes, 1,62 Mio. ALL-Zellen des onkologischen Patienten, 0,9 Mio. Zellen der lymphatischen Zelllinie 207, 0,9 Mio. der lymphatischen Zelllinie 694 und 0,63 Mio. Zellen einer allogenen ALL. Die separierten, peripheren mononukleären Zellen (sowohl der Behandlungsgruppe als auch der Kontrollgruppe) wurden standardmäßig mit 2000 rad bestrahlt, wohingegen die Leukämiezellen und die Zellen beider Zelllinien mit 4000 rad bestrahlt wurden, um eine Proliferation dieser Zellen auszuschließen (eigene Untersuchungen, vgl. Kapitel 2.4). Diese Zellen werden im folgenden als Stimulatoren (S) bezeichnet im Gegensatz zu den unbestrahlten mononukleären Zellen (im Folgenden als Responder (R)-Zellen bezeichnet).

Nach dem Bestrahlen wurden die Zellen in 96 well- Rundbodenplatten⁶ pipettiert. Folgendes Schema wurde hierbei angewendet:

- Alle äußeren wells wurden mit reinem RPMI pipettiert, um mögliche Verdunstungen aus den Zell-wells zu minimieren.
- Es wurde jeweils ein "Responder" (entweder der onkologische Patient oder das Kontrollkind) mit einem bestrahlten Zelltyp (Stimulator) kombiniert.
- In jedes well wurden je 30.000 Responder-Zellen und 30.000 Stimulator-Zellen pipettiert.
- Alle wells mit Zellen wurden auf eine Gesamtzellzahl von 60.000 Zellen in 200µl RPMI mit 15%FCS eingestellt.
- Jede Kombination wurde 3fach pipettiert, um Pipettierfehler zu minimieren.
- Hinsichtlich weiterer Kontrollen wird auf das Kapitel 2.4 Vorversuche und Kontrollen verwiesen

Nach dem Pipetieren wurden die Platten in einer Sterilkammer, deren Boden mit Aqua dest. benetzt war, in den Brutschrank⁷ gestellt und bei 37°C und 5% CO₂ in gesättigter humider Atmosphäre für 5 Tage bebrütet.

⁶ 96-well Tissue plates, U-form der Fa COSTAR, Kat No 3799

⁷ Brutschrank "Funktion Linie" der Fa Heraeus

2.3.4. FACS-Untersuchungen vor MLC

Zur weiteren Charakterisierung der bei der MLC eingesetzten ALL-Zellen der Patienten wurde ein Teil der aufgetauten ALL-Zellen für zusätzliche Oberflächenantigenuntersuchungen markiert. Insbesondere wurden diese costimulatorischen Oberflächenantigenen CD80/CD86 sowie nach dem apoptosevermittelnden CD95 gesucht. Hierbei wurden nach Ansetzen der MLC die bei 4°C gelagerten restlichen Zellen nach dem in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Verfahren gefärbt und gemessen. Die verwendeten Antikörperkombinationen sind in Tabelle 2.8 aufgeführt.

FACS-Klassifizierung der ALL Zellen		
FITC	PE	TC
CD80	CD40	CD19
	HLA-A,B,C	
CD86	CD40L	CD19
CD95	CD86 (IT-2)	CD19

Tabelle 2.8 FACS-Klassifizierung der ALL-(Target)-Zellen

2.3.5. Cell-Proliferation-ELISA

Der Nachweis der Proliferation von peripheren mononukleären Zellen als Zeichen für eine immunologische Reaktion auf die ALL-Zellen wurde mit Hilfe des Cell-Proliferation-ELISA's⁸ nachgewiesen und am Ende der MLC durchgeführt.

Am Abend des 5. Tages nach Ansetzen der MLC wurde den Zellen 25µl 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) hinzugefügt und anschließend für weitere 12 Stunden inkubiert. Am Morgen des 6. Tages erfolgte die Probenaufarbeitung nach folgendem Schema, wobei alle verwendeten Reagenzien (inkl. des BrdU) aus dem Cell-Proliferation-Kit stammen und alle Fixierungs-, Inkubations- und Entwicklungsschritte, wenn nicht anders angegeben, im Dunkeln und bei Raumtemperatur durchgeführt werden mussten:

Die Zellen wurden in 96-well Flachbodengefäße⁹ überführt, anschließend bei 300g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zum Fixieren der Zellen am Boden der

⁸ BrdU-Proliferation-ELISA, Fa Roche, Kat No. 1669915

⁹ 96 well Flachboden-Kulturplatten der Fa Labortechnik Greiner, Kat No 655180

Platte wurde sie ca. 15min mit einem Heißlufttrockner getrocknet. Im folgenden wurden die Zellen nochmals mit 200µl FixDenat für 45min fixiert und nach Abkippen der Fixierungslösung mit jeweils 100µl anti-BrdU-POD Lösung für 90min zur Markierung inkubiert. Anschließend wurden die wells dreimal mit jeweils 250µl Waschlösung ausgewaschen und mit jeweils 100µl Substratlösung entwickelt. Die Entwicklung erfolgte unter ständigem Schütteln bei ca. 60 U/min auf dem Rütteltisch und wurde nach 12min mit 4M H₂SO₄ abgestoppt. Gemessen wurde dann nach einer zusätzlichen 20s dauernden Schüttelphase mittlerer Stärke in einem ELISA Reader¹⁰ bei 540 nm. Die Readerwerte wurde mit dem Programm Base[®] der Fa SLT¹¹ gelesen und ausgedruckt.

2.3.6. Cell-Death-Detection-ELISA

Zum Apoptosenachweis wurde der Cell-Death-Detection-ELISA¹² (CDDE) verwendet, der DNA-Fragmente inkl. Histonkomplexen von charakteristischer Länge (200-400 bp) als Kennzeichen der mittleren Phase der Apoptose nachweist. Hierzu wurde wie folgt verfahren:

Nach Vorbereiten der Lösungen nach Vorschrift des Herstellers wurden die drei wells jeweils gleichen Inhaltes (z.B. Responder 1 mit Stimulator 2) in je ein Eppendorf Cup pipettiert und bei 400g 5min zentrifugiert. Danach erfolgte ein Waschschriff mit jeweils 1 ml Kulturmedium und eine erneute Zentrifugation bei 300g. Danach schloss sich eine 30minütige Inkubation mit jeweils 500µl Inkubationspuffer bei 4°C an. Anschließend erfolgte eine Ultrazentrifugation bei 12.000 U/min (2200g) für 10min. Im Überstand sammelten sich hierbei Stränge der gelösten DNA mit typischer Länge. Davon wurden 40µl mit 360µl Inkubationspuffer verdünnt und bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung 12h als Probenlösung gelagert. Am 5.Tag der MLC wurde die Entwicklungsplatte für den CDDE wie folgt beschichtet:

- 1 ml Anti-Histon Lösung in 9 ml Beschichtungspuffer lösen
- je 100µl dieser Beschichtungslösung in jedes well pipettieren
- mit beiliegender Folie abdecken
- über Nacht (ca. 12 h) bei 4°C inkubieren

¹⁰ ELISA-Reader "Spectra" der Fa SLT, Grödig, Austria

¹¹ Firma SLT Labinstruments, Grödig, Austria

¹² Cell-Death-Detection-ELISA[®] der Fa Boeringer Mannheim, Kat No 1544675

Der eigentliche ELISA gliederte sich in folgende Abschnitte:

Zuerst wurde die beschichtete Platte abgesaugt und mit 200µl Inkubationspuffer 30min abgedeckt. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die wells jeweils dreimal mit je 250µl gewaschen. Jetzt erfolgte das Pipettieren der am Abend zuvor gewonnenen Probenlösungen, und zwar in Tripel-Werten, jeweils 100µl/well. Diese wurden 90min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Ausklopfen und dreimaligem Waschen mit der dem Testkit beigefügten Waschlösung (jeweils mit 250µl/well) wurde 100µl Konjugatlösung in jedes well pipettiert, mit Folie abgedeckt und erneut 90min inkubiert. Nach dem Entfernen der Konjugatlösung und erneutem dreimaligen Waschen wurden 100µl Substrat / well zugegeben. Nach 14min Entwicklung auf dem Plattenrüttler bei 250 U/min wurden die ELISA-Platten bei 405 nm mit dem ELISA-Reader vermessen und ausgewertet.

2.3.7. Untersuchungen nach MLC

Zur Unterscheidung, welche der eingesetzten Zellen während der MLC apoptotisch bzw. nekrotisch wurden, wurden nach der MLC noch weitere FACS-Untersuchungen vorgenommen. Diese waren im Einzelnen:

Zum Nachweis von Veränderungen an der Zelloberfläche bei Apoptose wurden nach der Cokultur von Patienten-PMC mit den eigenen ALL-Zellen noch eine Doppelmarkerfärbung mit dem Apoptest¹³ durchgeführt. Hierzu wurden die bebrüteten Zellsuspensionen in einzelne wells einer 96-well Platte überführt und mit 50µl des Apoptest -Agens und jeweils 10µl CD3-FITC der Fa Dako markiert und anschließend wie die anderen FACS-Markierungen behandelt, gemessen und ausgewertet (vgl. Kapitel 2.3.1).

Ebenso wurde eine Doppelmarkerfärbung mit 10µl CD3-FITC der Fa Dako mit 7-Aminoaktinomycin¹⁴ (7-AAD) in der Konzentration 20 µg/ml derselben Responder/Stimulator-Kombination durchgeführt, um einen weiteren Apoptosenachweis zu erhalten. Eine Propidiumjodidfärbung¹⁵ mit 5µg/ml derselben Zellen schloss sich an.

¹³ APOPTTEST der Fa dianova, Kat No APT001

¹⁴ 7-Aminoaktinomycin der Fa Sigma Chemical, Kat No A-9400

¹⁵ Propidiumjodid der Fa Sigma, Kat No P-4170

Alle Färbungen wurden nach dem in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Färbe- und Messprotokoll durchgeführt.

2.3.8. Nachweis der mRNA verschiedener Zytokine mittels rT-PCR

Als Hinweis für eine gezielte Immunantwort der proliferierenden Zellen wurde in einem Teil der Patienten eine rT-PCR auf mRNA bestimmter klassischer Aktivierungsprodukte durchgeführt.

Vor und nach MLC wurden jeweils 120.000 Zellen des Gemisches Responder 1 (Patienten der onkologischen Tagesklinik) und Stimulator 3 (eigene ALL-Zellen) in Chomczynski-Lösung¹⁶ (nach [16]) gelagert zur weiteren diagnostischen Aufarbeitung der gebildeten Zytokine. Der Nachweis von mRNA wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Zusammenführen der 3 gleichen Wells und Zentrifugation bei 1200g und 4°C
- Aufnahme des Zellpellets in **0,5 ml Chomczynski-Lösung** aufnehmen (ab jetzt sind Zellen fixiert, Lagerung über wenige Monate möglich)
- Zugabe von **50µl 2M Na-acetat**
- Zugabe von **0,6ml Phenol-Chloroform 5:1** (=Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 125:24:1)
- Nach 15minütiger Inkubation auf Eis für 20min bei 4°C und ca. 10.000g zentrifugieren
- Überstand *ohne* Interphase vorsichtig abnehmen
- Zugabe von **1,2 ml 100% Ethanol** (eisgekühlt)
- Inkubation für 1h bei -20°C
- Zentrifugation für 15min bei 4°C und ca. 10.000g
- Aufnahme des RNA-Pellet in **150µl Chomczynski-Lösung**
- Zugabe von **10µl 3M Na-acetat pH 5,2**
- Zugabe von 300µl 100% Ethanol (eisgekühlt)
- Inkubation für 1h bei -20°C
- Zentrifugation für 15min bei 4°C und ca. 10.000g
- Waschen des RNA-Pellet in **1ml 70%Ethanol** (eisgekühlt)
- Zentrifugation bei 15min bei 4°C und ca. 10.000g
- Anschl. Lösung abpipettieren und trocknen lassen

¹⁶ **Chomczynski-Lösung**

4.4 M Guanidin-Thiocyanat 6 ml

0.75 M Citrat 220µl

10% Sarcosyl 330µl

Mercaptoethanol 47.5 µl

- RNA-Pellet in 38,8µl Bideest/DEPC¹⁷ aufnehmen

Nach Extraktion der mRNA und Umschreiben in cDNA mittels RT-PCR wurde eine β -Aktin-PCR als Kontrolle für die Fehlerfreiheit des Reinigungs- und Gewinnungsprozesses der RNA nachgewiesen. Bei einem sichtbaren Signal erfolgte der Nachweis von CD3, CD19, fas-Ligand, TNF β , Interleukin 2, Granzyme A und Granzyme B jeweils vor und nach der MLC. Eine Übersicht über die verwendeten Primer und deren Spezifikation findet sich in Tabelle 2.9.

Signal	Sequenz-Sense	Solllänge	Referenz
β -actin	tgacggggtcacccacactgtgccatcta	661 bp	[80]
CD 3	ggc tgt cct cat cct ggc tat cat	514 bp	[50]
CD 19	gct acg aga acc ctg agg atg ag	305 bp	[50]
FasL/CD178		239 bp	[104]
CD95/fas	ggcctgcac atgatggcca attc	806 bp	[47]
IL-2	atgtacaggatgcaactcctgtctt	457 bp	[105]

Tabelle 2.9 Übersicht über die in der RT-PCR verwendeten Primer mit Referenzen

2.3.9. Auswertung und statistische Analyse

Wegen der geringen Gruppengröße wurden meist nichtparametrische Testverfahren angewendet, so beim Inter-Gruppenvergleich der Mann-Whitney-U-Test, beim Intra-Gruppenvergleich der Wilcoxon-Test. Alle Ergebnisse wurden ebenfalls mittels des Kolmogorov-Smirnov-Testes auf Normalverteilung geprüft. Lag diese vor, so wurden Korrelationen mit dem Pearson-Korrelationskoeffizienten, ansonsten mit dem unabhängigen Spearman-Koeffizienten zum Nachweis von Zusammenhängen berechnet. Zusätzlich wurde bei Normalverteilung auch noch ein Vergleich der Mittelwerte mit verschiedenen T-Tests durchgeführt.

¹⁷ **Bideest/DEPC:**

2 ml Diethyl-Pyrocbonat (Sigma: D-5758)

ad 2000 ml Aqua_{Bideest}

2.4. Vorversuche und Kontrollen

2.4.1. Proliferation-Detection-ELISA (BrdU-Test)

Der BrdU-ELISA-Kit der Fa Boehringer Mannheim stellt eine nichtradioaktive Alternative zum klassischen ^3H -Thymidin-Einbau dar. Um vergleich- und wiederholbare Ergebnisse zu erhalten, wurde mit verschiedenen MLC-Ansätzen sowohl die klassische ^3H -Thymidin mit dem der BrdU-Einbau verglichen, als auch am original ELISA-Protokoll der Fa Boehringer Mannheim Modifikationen vorgenommen.

Als Versuchszellen wurden lymphatische Zelllinien, periphere mononukleäre Zellen erwachsener freiwilliger Spender und Zellpools verwendet. Der Ansatz der MLC erfolgte nach dem in 2.2 und 2.3 beschriebenen Verfahren. Die Kontrollen betrafen alle Bereiche der Probenaufbereitung, der Inkubation sowie der letztendlichen Verarbeitung des ELISAs bzw. des ^3H -Thymidin-Einbaus.

Hierbei wurden speziell die Einwirkungsdauer mit BrdU auf 12h wie auch die einzelnen Entwicklungsschritte innerhalb des ELISAs ausgedehnt, die einzelnen Modifikationen finden sich in Tabelle 2.10.

Test	Testvergleich	Modifikation / Ergebnis
1	Nur BrdU: erste MLC mit peripheren mononukleären Zellen von Kindern in der Dauertherapie	allgemein schwache Proliferation;
2	Vergleich BrdU - ^3H -Thymidineinbau, sonst wie 1, zusätzlich PHA und Convallin A -Stimulierung	allgemein schwache Proliferation; sowohl im BrdU als auch im ^3H -Thymidineinbau, andere Testpersonen nötig
3	Vergleich BrdU- ^3H -Thymidineinbau bei gesunden erwachsenen Spendern von PMC	weiterhin schwache allg. Stimulation in beiden Testverfahren
4	Brutschrank-Vergleich um Gerätefehler auszuschließen und FCS-HS Vergleich, wieder werden beide Messverfahren beteiligt	sowohl ^3H -Thymidineinbau als auch BrdU-Tests zeigen bei 15% HS bessere Proliferation
5	erneuter Brutschrank Test mit 15 %FCS im Medium; als Zellen werden wiederum PMZ erwachsener Spender verwendet	gute Proliferationsergebnisse, Start der Studie

Tabelle 2.10 Zusammenfassung der Proliferationsvorversuche

2.4.2. Apoptose-ELISA

Der Cell-Death-Detection-ELISA misst spezielle Histon-Basenpaar-Komplexe, die im mittleren bis späten Stadium der Apoptose charakteristischerweise auftreten [27]. Da der klassische Nachweis der für die Apoptose charakteristischen Doppelstrangbrüche mit ca 180bp langen DNA-Leitern äquivalent zu den Ergebnissen des ELISAs ist [87], beschränkten sich die Vorversuche auf eine methodische Verfeinerung des vorgegeben Protokolls. Wie hierfür von Boehringer vorgeschlagen, wurden dazu periphere mononukleäre Zellen gesunder erwachsener Probanden und Zellen lymphatischer Zellreihen verwendet, die mit verschiedenen apoptoseauslösenden Substanzen behandelt wurden. Hierfür wurde im speziellen Camptothecin [36] und Prednisolon [6, 46] als Apoptose-auslösende Agenzien verwendet. Außerdem wurden die Zellkonzentrationen variiert, um die bei der MLC entstehenden unterschiedlichen Endkonzentrationen und deren Effekte besser abschätzen zu können. Die günstigsten Färbe- und Entwicklungsergebnisse zeigte der Test für die MLC Konzentrationen von 60.0000 Zellen/ml bzw. 120.000 Zellen/well. Auch die Entwicklungsschritte wurden so angepasst, dass eine deutliche Färbung bei Apoptose gesichert wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.11 zusammengefasst.

Einfluss verschiedener Konzentrationen von Camptothecin auf die lymphatische Zelllinie 697 ¹⁸		
Zellzahl/well	4 µg/ml Camptothecin	10 µg/ml Camptothecin
250.000 Z	0,4	0,4
Periphere mononukleäre Zellen gesunder erwachsener Versuchsperson: Einfluß verschiedener Zellkonzentrationen		
Zellen/well	+ 6µg Camptothecin ¹⁴	+ 12 µg Camptothecin ¹⁴
2.000.000	3,8	4,5
1.000.000	4,6	4,8
500.000	4,3	5,5
250.000	5,9	6,6
125.000	12,0	9,8
62.500	8,0	7,0
Einfluss verschiedener Zellarten auf den Apoptose-ELISA: Vergleich gesunde periphere mononukleäre Zellen erwachsener Versuchsperson (VP) mit kryokonservierten Leukämiezellen (ALL)		
	+ 6µg Camptothecin ¹⁴	+ 12 µg Camptothecin ¹⁴
125.00 Zellen von VP	4,1	4,8
62.500 Zellen von VP	6	7,6
125.000 Zellen von ALL	2,7	5,5
62.500 Zellen von ALL	1,7	2,1

Tabelle 2.11 Übersicht über verschiedene Apoptoseexperimente

¹⁸ Die Werte der Tabelle geben das Verhältnis von maximaler Apoptose zu spontaner Apoptose wieder und errechnen sich wie folgt:

$$\frac{\text{Mittelwert (Readerwerte Zellen mit Camptothecin)}}{\text{Mittelwert (Readerwerte Zellen ohne Camptothecin)}}$$

2.4.3. Testimmanente Kontrollen

Die bereits in den Vorversuchen deutlich gewordene Variabilität der Proliferationsuntersuchungen machte eine größere Anzahl von Kontrollen notwendig. Diese erstreckten sich sowohl auf biologische "Nullwerte" und Positivkontrollen, als auch auf die Testprozeduren. Im einzelnen wurden die Proliferationsergebnisse folgendermaßen geprüft:

Als Grundproliferation bzw. Negativkontrolle wurde immer die gemessene BrdU-Stärke der Kombination Responder X gegen den gleichen Stimulator X genommen, d.h. dass bestrahlte und unbestrahlte Zellen derselben Blutprobe zusammen inkubiert waren. Dies wurde sowohl für die Patienten, als auch für die Kontrollproben verwendet. Als Positivkontrolle der Proliferation wurde die Zelllinie 207 benutzt, die in allen Tests eine sehr gute Proliferation zeigte. Um eine Proliferation der ALL-Zellen auszuschließen, wurden diese ebenso als bestrahlt und unbestrahlt zusammen inkubiert.

Neben diesen biologischen Kontrollen erfolgten mehrere technische Kontrollen.

Es wurden immer Triple-Proben pipettiert, um sowohl Pipettierfehler als auch fehlende ELISA-Zusätze erkennbar zu machen. Um eine Selbstfärbung der Tests (sowohl BrdU- als auch CDD-ELISA) auszuschließen, wurden Negativ-Proben jeweils ohne Zellen mit allen Testreagenzien angesetzt. Beim BrdU-ELISA erfolgte zusätzlich noch die Einzelkontrolle der jeweiligen Responder/Stimulator-Paare mit den jeweiligen Nullwerten (also ohne BrdU-Zusatz) für jede einzelne Kombinationsart. Das bedeutet, dass auch bei starker Proliferation der Zellen eine Kreuzreaktion der Entwicklungsreagenzien des BrdU-Tests auszuschließen war.

3. Ergebnisse

Um die große Anzahl der Daten in verschiedenen Unterkapiteln übersichtlich zu präsentieren, werden zunächst die Ergebnisse der phänotypischen Oberflächenuntersuchungen gezeigt, anschließend die Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen, die im Anschluss der MLC durchgeführt wurden.

3.1. Ergebnisse der phänotypischen Untersuchungen mittels Fluoreszenz activated cell sorting (FACS)

Die FACS-Ergebnisse gliedern sich in drei Teile:

- die Untersuchung der peripheren mononukleären Zellen der Patienten während Dauertherapie,
- eine Betrachtung der ALL-Zellen der Patienten und schließlich
- sollte mittels einer post-MLC-Untersuchung eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose einzelner Subpopulationen in der MLC durchgeführt werden.

3.1.1. Verteilung der phänomorphologischen Merkmale auf PMNC bei Kindern mit ALL in der Dauertherapie

In dieser Arbeit wurde eine ganze Reihe an Subpopulationen von Lymphozyten gemäß den in Kapitel 2 vorgestellten Verfahren ermittelt. Eine Übersicht dieser Subpopulationen findet sich in Tabelle 3.1 bis , die einzelnen ausführlichen Charakterisierungen sind in Tabelle 6.3 bis Tabelle 6.8 zusammengefasst. Alle Werte, soweit nicht anders angegeben sind Prozentwerte von Subtypen bezogen auf alle MNC der Patienten; die angegebenen Normwerte entsprechen denen bei Kindern der Altersgruppe der Patienten.

	CD3 pos	davon TCR α/β^+	davon TCR γ/δ^+	T-4+ : T8+	NK-Zellen (16/56pos)	davon C 1.7+
MW	66,7	24,5	14,6	2,2	17,6	24,6
StdAbw	25,5	30,4	21,6	1,8	13,7	29,4

Tabelle 3.1 Übersicht über die Subpopulationen der untersuchten CD3⁺-Zellen der Patienten

	CD8+	davon Leu15+	davon CD25+	davon CD28+	davon CD45RA+	davon CD45R0+
MW	23,1	13,9	7,9	45,5	73,1	33,8
StdAbw	11,8	11,0	25,9	20,9	17,8	19,9

Tabelle 3.2 Übersicht über die Subpopulationen der untersuchten CD8⁺-Zellen der Patienten, Teil 1

	CD8+	davon CD57+	davon CD62+	davon CD69+	davon CD71+	davon CD122+	davon HLA DR+
MW	23,1	10,0	52,1	12,6	9,5	24,8	9,4
StdAbw	11,8	8,1	29,3	24,4	27,7	22,0	9,1

Tabelle 3.3 Übersicht über die Subpopulationen der untersuchten CD8⁺-Zellen der Patienten, Teil 2

	CD4+	davon CD28+	davon CD30+	davon CD45RA+	davon CD45R0+	davon CD122+
MW	40,7	69,5	0,2	48,9	58,1	32,0
StdAbw	15,7	11,0	0,3	18,4	18,7	21,6

Tabelle 3.4 Übersicht über die Subpopulationen der untersuchten CD4⁺-Zellen der Patienten, Teil 1

	CD4+	davon CD25+	davon CD62+	davon CD69+	davon CD71+	davon HLA DR+
MW	40,73	2,8	35,6	1,7	2,1	8,1
StdAbw.	15,7	3,1	25,4	2,8	4,1	8,6

Tabelle 3.5 Übersicht über die Subpopulationen der untersuchten CD4⁺-Zellen der Patienten, Teil 2

	CD20 +	% davon CD40+	% davon CD40L+	% davon CD80+	% davon CD86+	%davon CD95+
MW	3,3	66,0	24,5	15,4	48,6	34,8
StdAbw.	3,0	28,3	18,2	13,7	32,1	19,3

Tabelle 3.6 Übersicht über die Subpopulationen der untersuchten CD20⁺-Zellen der Patienten

	Antigen	Mittelwert (+/-Std.Abw.)	Ermittelt an Kindern im Alter der Patienten	Quelle
CD4 ⁺ -T-Lymphozyten				
	CD25	8,0 (+-1,2)	-	[83]
	CD28	17,6 (+-3,0)	+	[81]
	CD30	n.b.		
	CD45RA	63,3 (+-9,6)	+	[81]
	CD45RO	31,1 (+-8,6)	+	[81]
	HLA DR	2,4 (+-0,9)	+	[81]
	CD62	46,8 (+-11,9)	+	[81]
	CD69	80,0 (+-11,0)	-	[66]
	CD71	11,0 (n.b.)	-	[19]
	CD122	nicht nachweisbar	-	[83]
CD8 ⁺ T-Lymphozyten				
	C1.7	51,0 (+-8,0)	-	[88]
	Leu15 (CD11b)	30,0 (+/- n.b.)	-	[34]
	CD25	nicht nachweisbar	-	[83]
	CD28	68,3 {62,3-74,2}	+	[72]
	CD30	n.b.		
	CD45RA	n.b.		
	CD45RO	17,3 (+-7,3)	+	[81]
	CD57	73,3 (+-7,8)	+	[81]
	HLA DR	19,7 {15,5-24,0}	+	[56, 72]
	CD62	n.b.		
	CD69	75,0 (+-18,0)	-	[66]
	CD71	18,0 (n.b.)	-	[19]
	CD122	6,7 (+-n.b.)	-	[83]
B-Lymphozyten				
	CD40	100 {99-100}	-	[23]
	CD40L	n.b.		
	CD80	18,0 {10-22}	-	[23]
	CD86	5,0 {3-6}	-	[23]
	CD95	13,0 {8-17}	-	[23]

Tabelle 3.7 Zusammenfassung publizierter Normwerte für die Verteilung bestimmter Oberflächenantigene auf CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten sowie B-Lymphozyten. Soweit vorhanden, wurden altersspezifische Normwerte herangezogen und als Mittelwert (+/- Standardabweichung) präsentiert. In einigen Publikationen wurden nur Mittelwerte und Spannweiten der jeweiligen Ergebnisse angegeben, diese sind die Werte in {}. n.b.: nicht bekannt.

Zur besseren Verständlichkeit der im Folgenden beschriebenen Oberflächenantigene auf den verschiedenen Lymphozytensubpopulationen wurde versucht, die normale Verteilung der nachgewiesenen Oberflächenantigene graphisch zusammenzufassen (vgl. Abbildung 1). Die Ergebnisse liegen ebenfalls tabellarisch vor (vgl. Tabelle 3.7).

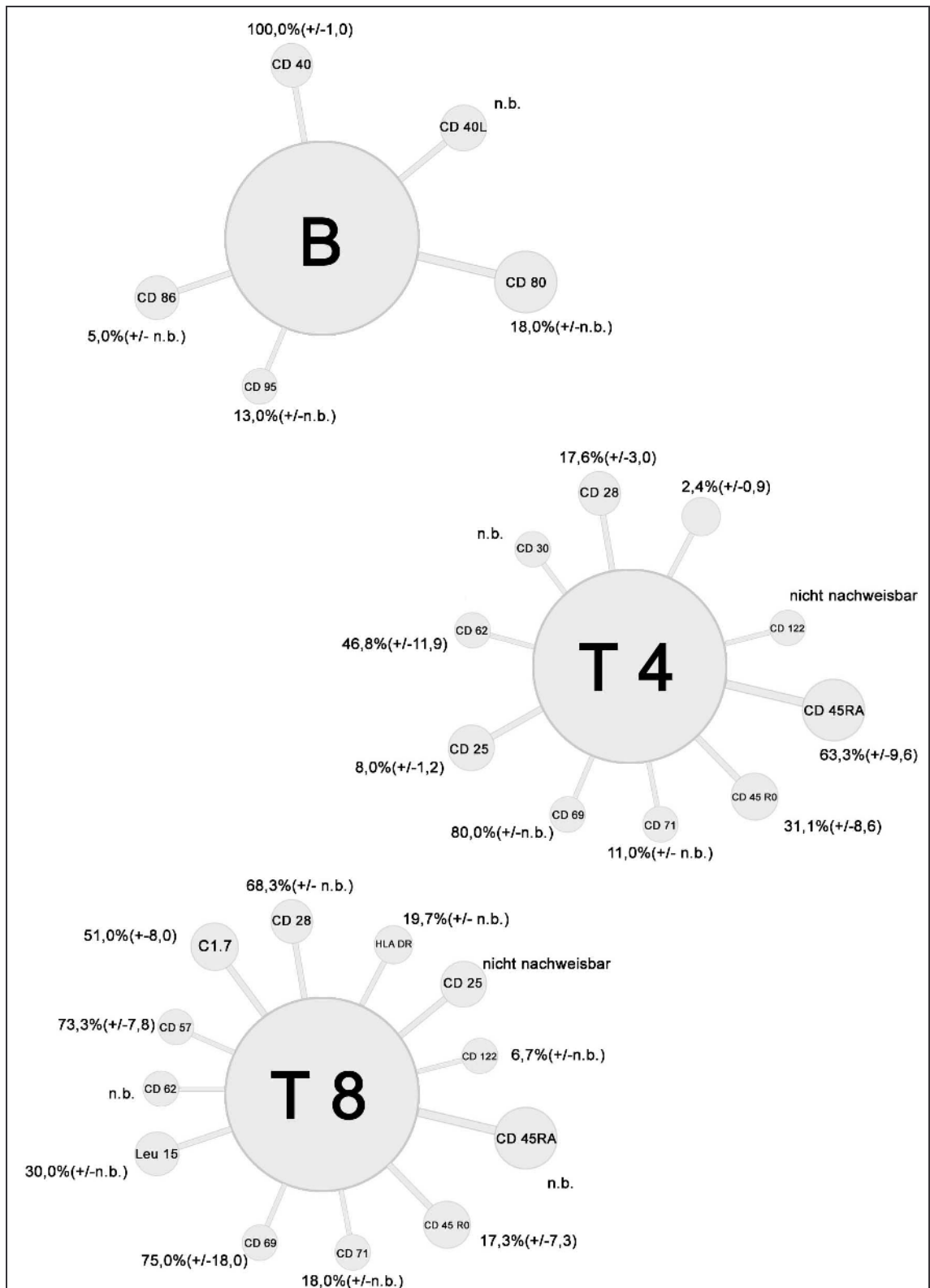


Abbildung 1 Normalwerte ausgewählter Oberflächenantigene bei bestimmten Lymphozytensubpopulationen aus der Literatur (vgl. [19, 23, 34, 56, 66, 72, 81, 83, 88]). Soweit vorhanden wurden altersspezifische, an die Patientengruppe angepasste Normwerte verwendet (vgl. Tabelle 3.7).

Von den CD3⁺-T-Zellen sind im Mittel (Standardabweichung) 27 % (+/-30) vom T-Zell Rezeptortyp α/β , und 9% (11%) vom γ/δ -Typ. Es zeigt sich jedoch ein überwiegender Teil von CD3⁺- Zellen, die weder den einen, noch den anderen T-Zell Rezeptortyp aufweisen, im Mittel ca. 50%(+/-33) (vgl. Tabelle 6.3). Der Anteil an NK-Zellen (CD3⁻ und CD16/56⁺) an der Gesamtheit der MNC beträgt 18% (+/-14), dieser ist im Vergleich zu gesunden Kindern leicht erhöht [81].

Genauere Analysen der Subgruppen von CD4 bzw. CD8 positiven Zellen ergeben folgendes Bild (vgl. Tabelle 3.1 bis Tabelle 3.5 Tabelle 3.6 sowie Tabelle 6.4 bis Tabelle 6.7):

Der T₄/T₈-Quotient zeigt eine Verschiebung zu Gunsten der T₄-Zellen, er liegt bei 2,5 (+/-1,76), besitzt aber eine Streubreite von 1,15 bis 7,57 (vgl. Abbildung 2).

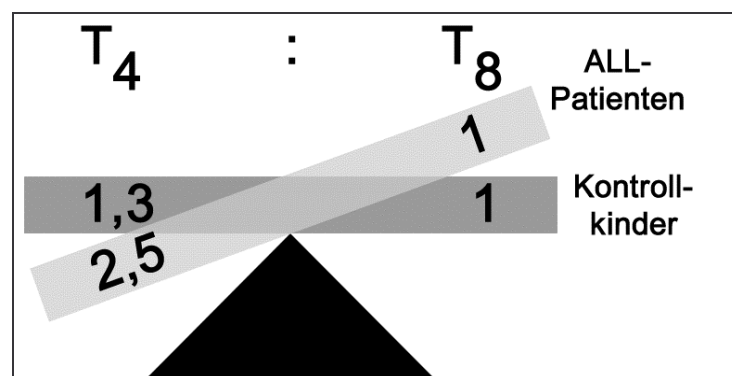


Abbildung 2: T4-T8-Quotient bei ALL-Patienten unter Dauertherapie

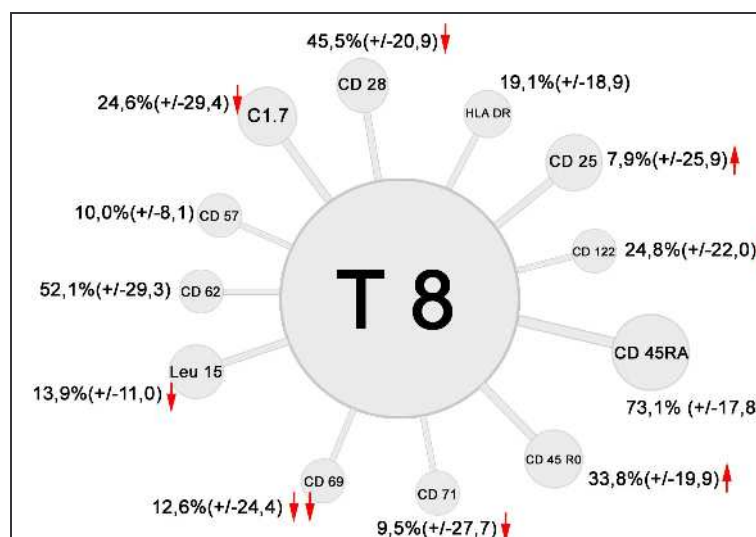


Abbildung 3: Mittlere Verteilung von Oberflächenantigenen auf CD8⁺-Zellen unter Dauertherapie bei Patienten mit ALL. Zahlen: MW (StdAbw.).

Die weiteren Werte der CD8⁺-Zellen der Patienten im Einzelnen (vgl. Abbildung 3): Normalwerte für C1.7 bei 24,6% (+/-29,4), Leu15 bei 13,9% (+/-11,0) und CD25 bei nur 7,9% (+/-25,9). Auffällig sind die Abweichungen bei dem costimulatorischen Molekül CD28, hier finden sich nur 45,5% (+/-20,9), d.h. die Hälfte mit positivem Nachweis. 73,1% (+/-17,8) der CD8⁺-Zellen sind CD45RA⁺, naive T-Zellen, während nur 33,8% (+/-19,9) CD45R0⁺ sind. Die Überschneidung um ca. 10% bei der Summe beider Werte ist durchgängig bei allen Patienten nachweisbar und scheint eine Übergangspopulation zu sein mit noch schwacher CD45RA- und bereits beginnender CD45R0-Expression [1, 86]. Ca. 9,1% (+/-7,6) der CD8⁺-Zellen sind CD57 positiv. CD62L ein Molekül, das bei der Zelladhäsion auf Memory-T-Zellen und NK-Zellen exprimiert wird [43, 76], ist bei 52,1% (+/-29,3) positiv, zeigt aber eine deutliche interindividuelle Varianz. CD69 und CD71 werden in 12,6% (+/-24,4) und 9,5% (+/-27,7) exprimiert. 24,8% (+/-22) der Zellen exprimieren CD122, den p75-Interleukin-2-Rezeptor. Auch hier zeigen sich wieder deutliche Unterschiede innerhalb der Patientengruppe. HLA DR wird zu 19,1% (+/-18,9) auf der Oberfläche der CD8⁺-Zellen gefunden.

Die CD4⁺-Population zeigt sich im Mittel etwas weniger variabel in der Expression von unterschiedlichen Oberflächenmolekülen (vgl. Abbildung 4). Bei den CD4⁺-Zellen der Patienten ergibt sich ein deutlicher Nachweis von costimulatorischem CD28, nämlich in 69,5% (+/-11). CD30 wird nur zu 0,2% (+/-0,3) exprimiert. Beim Vergleich naive/nicht-naive T-Zellen zeigt sich ein Überwiegen der CD45R0-positiven Zellen mit Anteil von 58,1% (+/-19) die CD45RA-positiven CD4⁺-Zellen mit 48,9%(+/-18,4) vertreten sind. Der Interleukin-2-Rezeptor CD122 wird im Mittel in 32,0% (+/-21,6) auf den T₄-Zellen exprimiert, wiederum mit einer sehr breiten Streuung. Weitere bestimmte Oberflächenmarker sind CD25 mit 2,8% (+/-3,1), CD62 mit 35,6% (+/-25,4), CD69 mit 1,7% (+/-2,8) sowie CD71 mit 2,1% (+/-4,1). Das HLA DR wird zu 8,1% (+/-8,6) auf T₄-Zellen exprimiert.

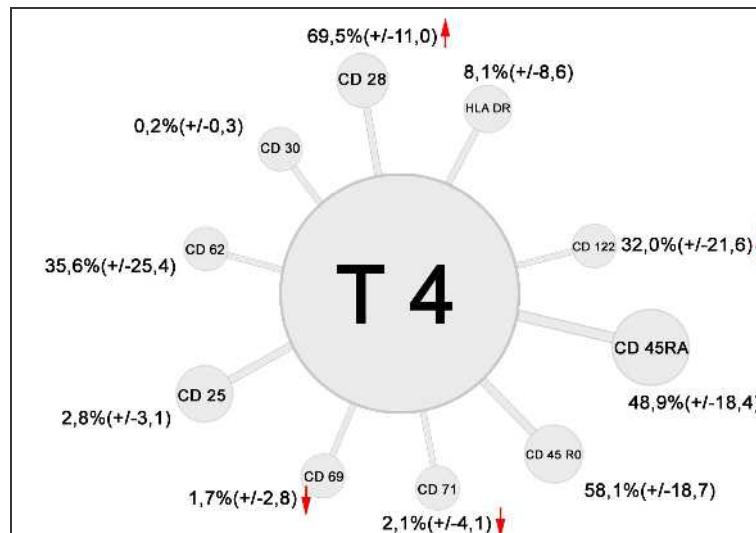


Abbildung 4: Mittlere Verteilung von ausgewählten Oberflächenantigenen auf CD4⁺-Zellen bei Patienten mit ALL unter Dauertherapie, Zahlen MW (StdAbw.).

Bei der Charakterisierung der während der Erhaltungstherapie im peripheren Blut vorhandenen B-Zellen konnten folgende Ergebnisse gewonnen werden: Im Mittel liegt die Zahl der B-Zellen (als CD20-positiv charakterisiert) bei 3,3% (+/-2,9) aller MNC. Von diesen sind 19,4% (+/-26,7) CD40-positiv, mit einer wie bei allen jetzt folgenden Werten relativ großen Standardabweichung. Im Mittel 24,5%(+/-18,2) aller B-Zellen exprimieren zudem CD40-Ligand. Der Nachweis der costimulatorischen Moleküle CD80 gelingt bei nur 15,4 % (+/-13,7), CD86 wird immerhin von 48,6% (+/-32,1) der Zellen exprimiert. 34,8% (+/-19,3) aller B-Zellen exprimieren CD95 (vgl. Abbildung 5).

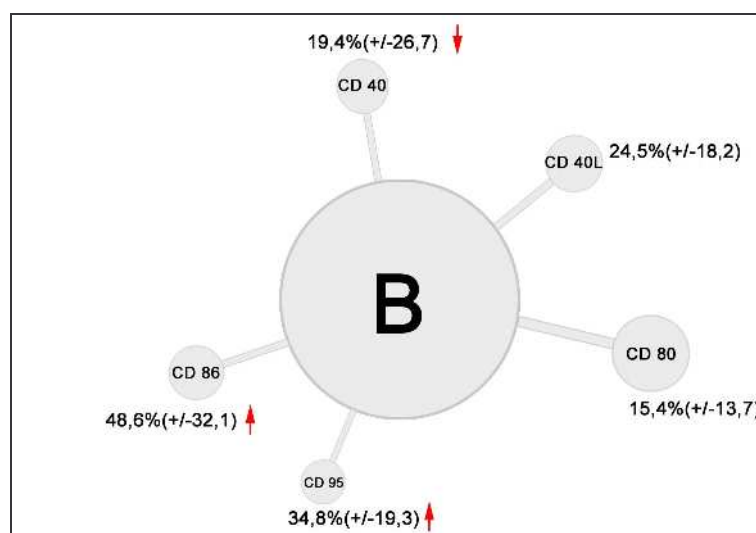


Abbildung 5: Verteilung von Oberflächenantigenen auf B-Zellen bei Patienten mit ALL, Zahlen MW (StdAbw.)

3.1.2. Charakterisierung der PMNC unter Dauertherapie einzelner Patienten

Wie bereits in dem vorangegangenen Kapitel erläutert und veranschaulicht war die Zusammensetzung der PMNC bei den verschiedenen Patienten deutlich unterschiedlich. Auf Grund der niedrigen Fallzahl ließen sich jedoch nur wenige signifikante Unterschiede nachweisen. Um dennoch zumindest Tendenzen aufzuzeigen, wurden die einzelnen Patienten nochmals einzeln ausgewertet und die Zusammensetzung der einzelnen T- und B-Zellpopulationen grafisch veranschaulicht.

Bei Patient 1 (vgl. Abbildung 6) fallen im Vergleich zu den anderen Patienten insbesondere erhöhte Werte bei CD122 und Leu15 (auf CD8⁺- bzw. CD4⁺-Zellen) auf.

Bei Patient 2 (vgl. Abbildung 7) sind vor allem die deutlich niedrigere CD122 und CD28-Expression auf den CD8⁺-Zellen zu beschreiben, sie geht einher mit einer Erhöhung der CD86 Expression von B-Lymphozyten.

Bei Patient 3 (vgl. Abbildung 8) zeigt sich bei den CD4⁺- und CD8⁺-Zellen eine kaum nachweisbare CD62-Expression, ebenso wie eine reduzierte HLA DR-Expression. Auffällig ist hier bei den B-Lymphozyten eine vergleichsweise ausgeprägte CD80/CD86-Expression.

Es findet sich bei Patient 4 (vgl. Abbildung 9) ebenfalls eine im Vergleich zu den anderen Patienten leicht verminderte CD28 sowie des C1.7 Expression der CD8⁺-Zellen, sowie eine vermehrte CD62-Expression ebenfalls auf den CD8⁺-Zellen.

Bei Patient 5 (vgl. Abbildung 10) fällt die fehlende CD95 (Fas) Expression auf den B-Lymphozyten, sowie die erhöhte CD62 (L-Selectin, ein Adhäsionsmolekül) Expression sowohl auf den CD4⁺- wie auch auf den CD8⁺-Zellen auf.

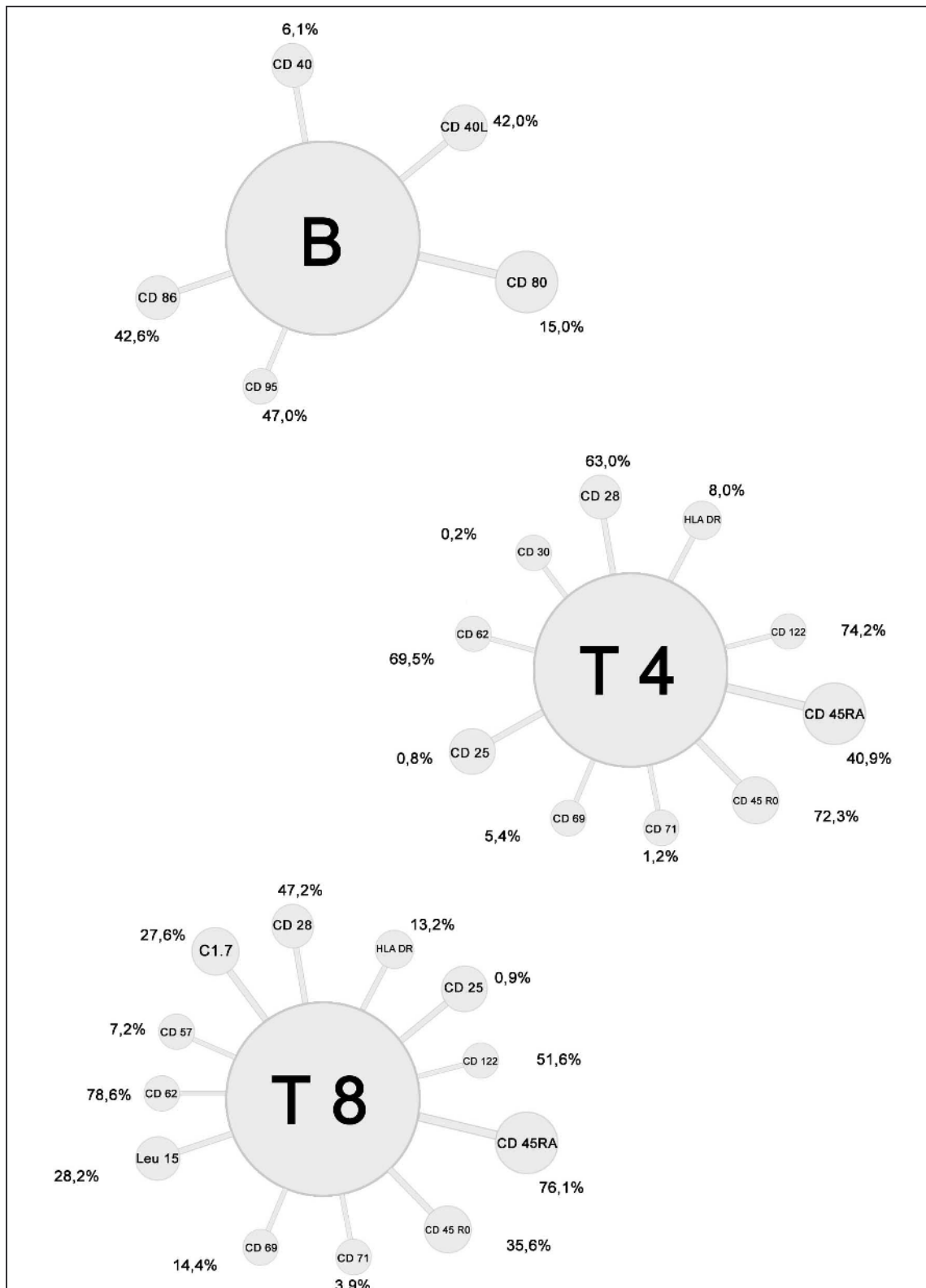


Abbildung 6: Patient 1, Charakterisierung PMNC. Die Summe der CD45RA- und CD45R0-Werte (bei den CD4⁺ und CD8⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellem Setzen der Lymphozytengates über 100%.

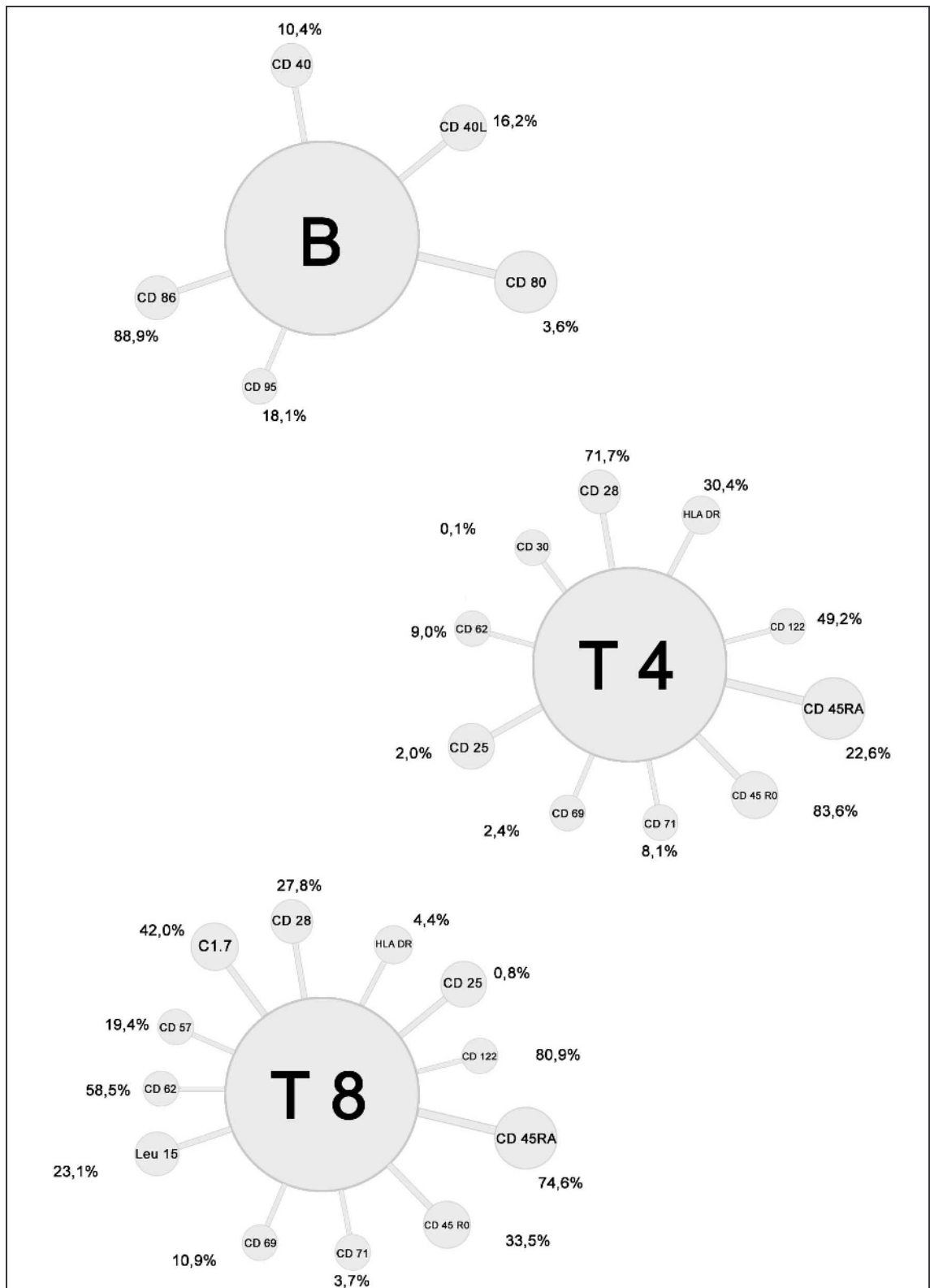


Abbildung 7: Patient 2, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA und CD45R0-Werte (bei den CD4⁺ und CD8⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellem Setzen der Lymphozytengates über 100%.

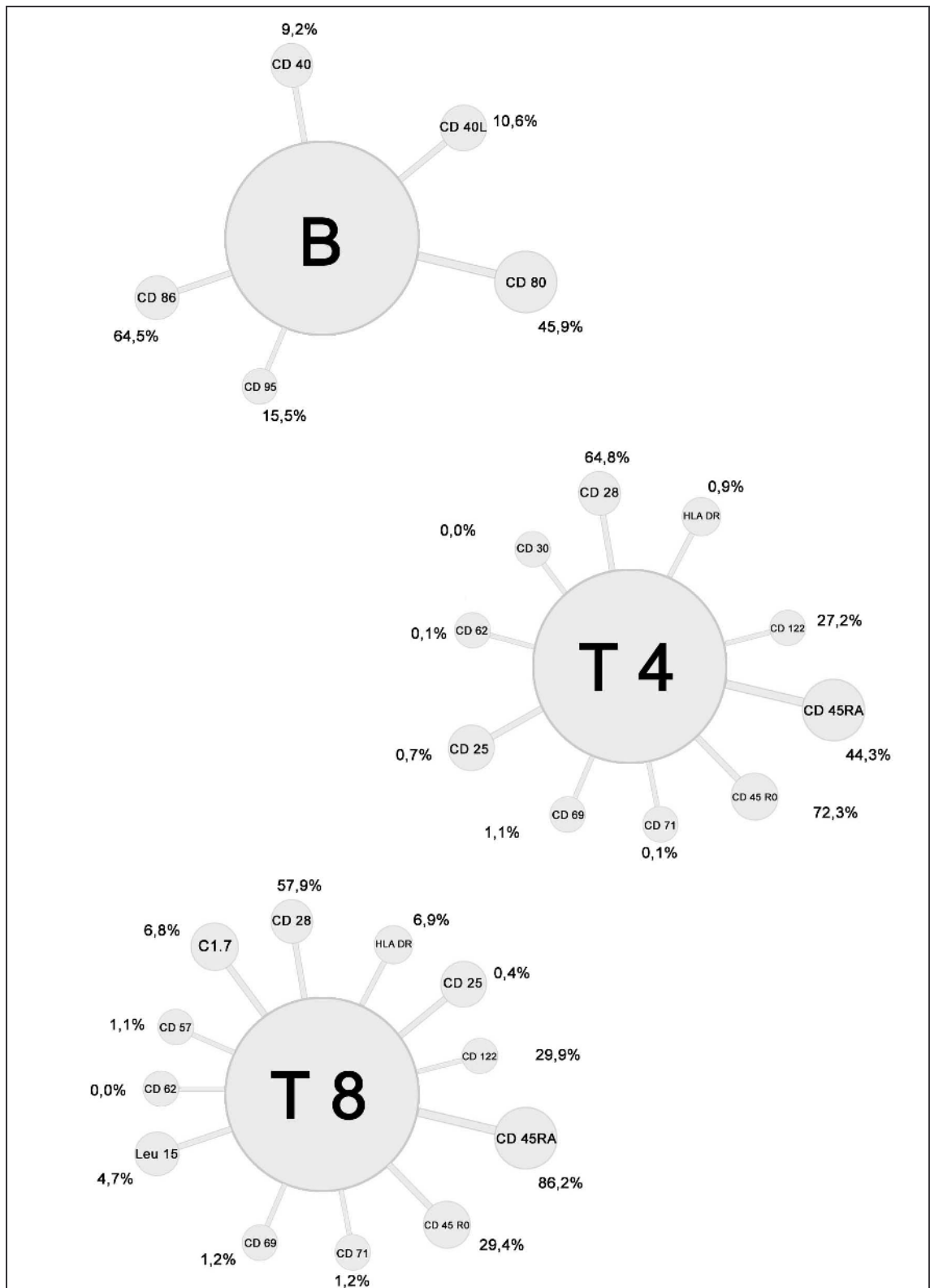


Abbildung 8: Patient 3, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA und CD45R0- Werte (bei den CD4⁺ und CD8⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%

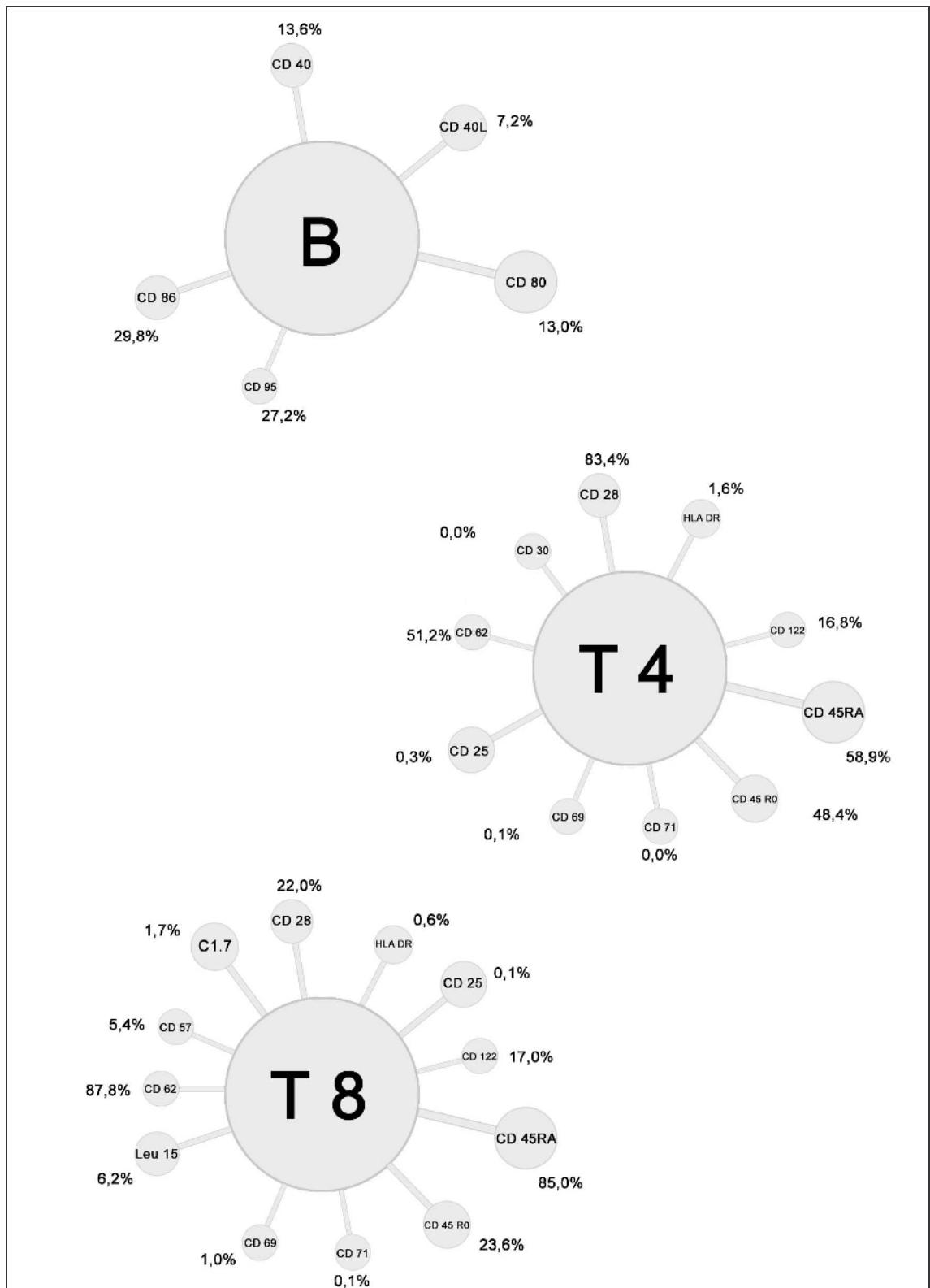


Abbildung 9 : Patient 4, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA- und CD45R0-Werte (bei den CD4⁺ und CD8⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%.

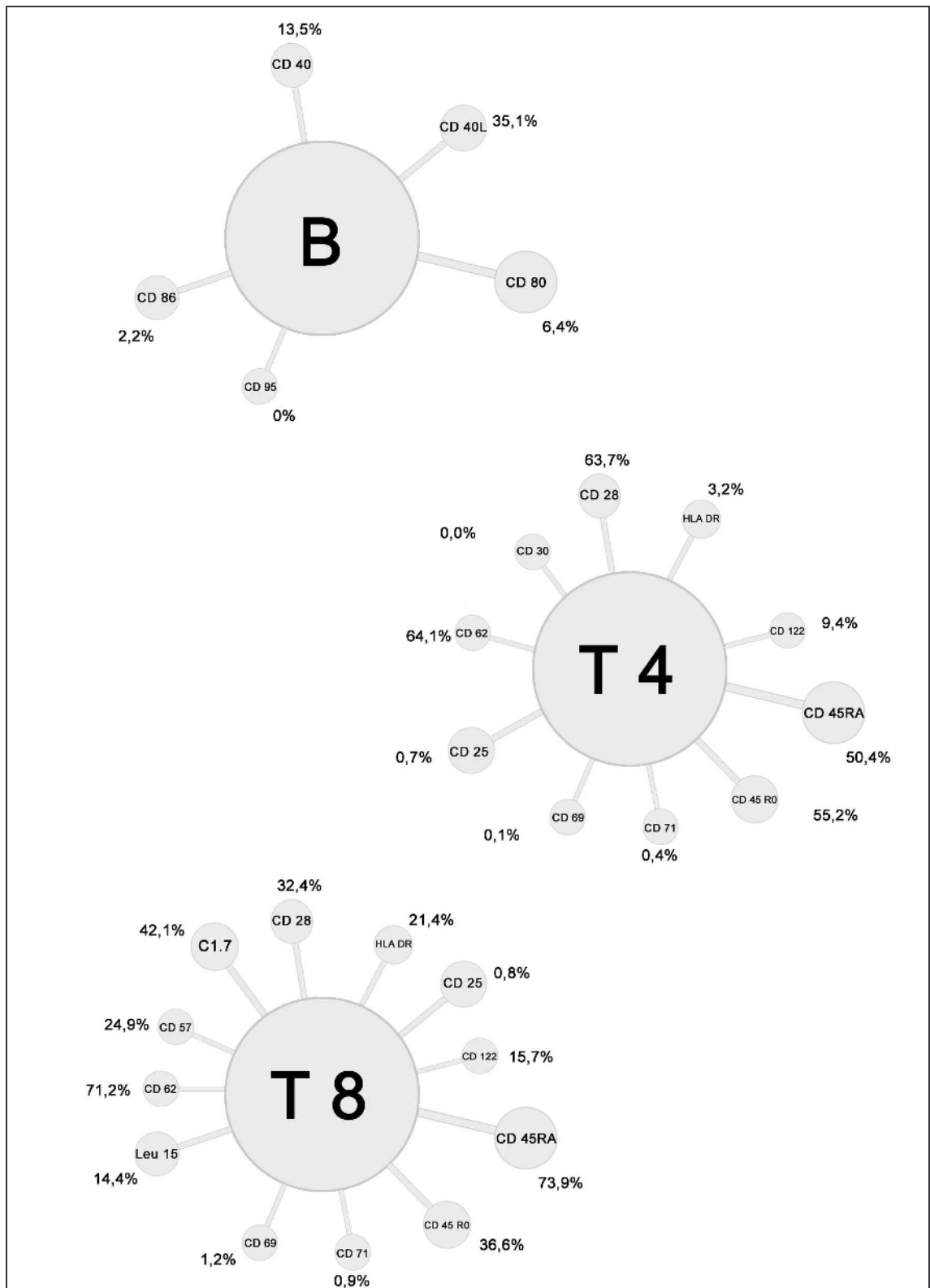


Abbildung 10: Patient 5, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA- und CD45R0-Werte (bei den CD4⁺ und CD8⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%

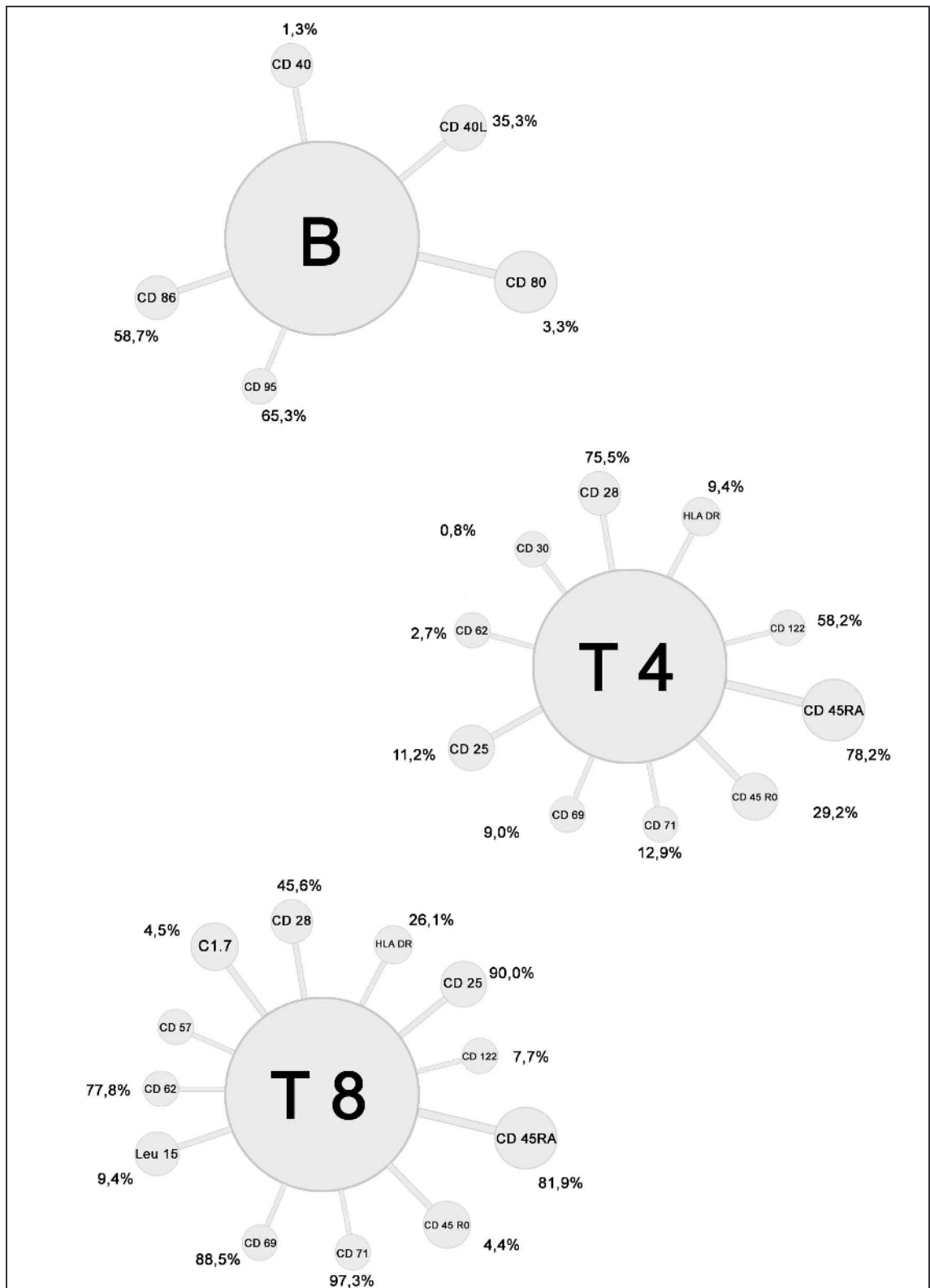


Abbildung 11: Patient 6, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA- und CD45R0-Werte (bei den CD4⁺ und CD8⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%

Bei Patient 6 (vgl. Abbildung 11) ist die Expression von CD95 hoch-, alle weiteren untersuchten Oberflächenmarker auf den B-Lymphozyten runterreguliert. Bei den CD4⁺-Zellen fällt ein hoher Anteil an CD45RO-Expression auf, auf den CD8⁺-Zellen ist der CD28, der Rezeptor des CD80/CD86, hochreguliert. Die Expression von CD86 auf den B-Zellen von Patient 7 (vgl. Abbildung 12) ist ebenso wie CD122 auf den CD4⁺-Zellen deutlich vermindert.

Im Gegensatz zu Patient 6 ist die Expression von CD62 auf den CD8⁺-Zellen bei Patient 7 deutlich positiv, ca. 81% der CD8⁺-Lymphozyten exprimieren dieses Oberflächenantigen.

Die B-Lymphozyten von Patient 8 zeigen an der Oberfläche eine verminderte CD80-, jedoch eine deutlich gesteigerte CD86-Expression (vgl. hierzu Abbildung 13). Die T₄ Lymphozyten zeigen keine auffälligen Expressionsmuster im Vergleich zu den Mustern der anderen Patienten, ebenso wie die T₈ Lymphozyten, die bis auf eine leicht erhöhte Expression von C1.7, einem vermeintlichen Aktivierungsantigen [88] sowie Leu15 (CD11b), einem Antigen, welches bei CD8⁺-Zellen eigentlich eher bei der Suppression der T-Zell-Antwort vermehrt exprimiert wird [34].

Bei Patient 9 fielen besonders die ausgeprägte Expression von CD40 auf den B-Lymphozyten auf. Nahezu alle B-Zellen dieses Patienten tragen dieses Rezeptormolekül, welches eine Schlüsselrolle in der Differenzierung der B-Zellen besitzt [64]. Leider konnten bei diesem Patienten nur ein Teil der Oberflächenmarker bestimmt werden (vgl. Abbildung 14), da nicht ausreichend Lymphozyten aus den Blutproben gewonnen wurden.

Einige besondere Expressionsmuster zeigen sich bei Patient 10: Auf den CD8⁺-Zellen wird das Aktivierungsantigen C1.7 erneut stark exprimiert, im Gegensatz zu allen anderen eine Aktivierung anzeigenden Oberflächenmarkern: sowohl CD122 (die p75Domäne des Il-2-Rezeptors), als auch CD28 und CD69 (einem frühe Aktivierungsantigen) sind eher vermindert exprimiert (vgl. Abbildung 15). Und die peripheren B-Lymphozyten zeigen eine Coexpression von CD40 und CD40L, ein eigentlich ungewöhnliches Verhalten, dass sowohl Rezeptor als auch dessen Ligand in erhöhter Zahl auf der selben Zelle gebildet werden. Wieder ist, wie bei einigen anderen Patienten, bei niedrigem CD28 auf den CD8⁺-Zellen das CD86 auf den B-Zellen erhöht exprimiert (vgl. Kap.4.1).

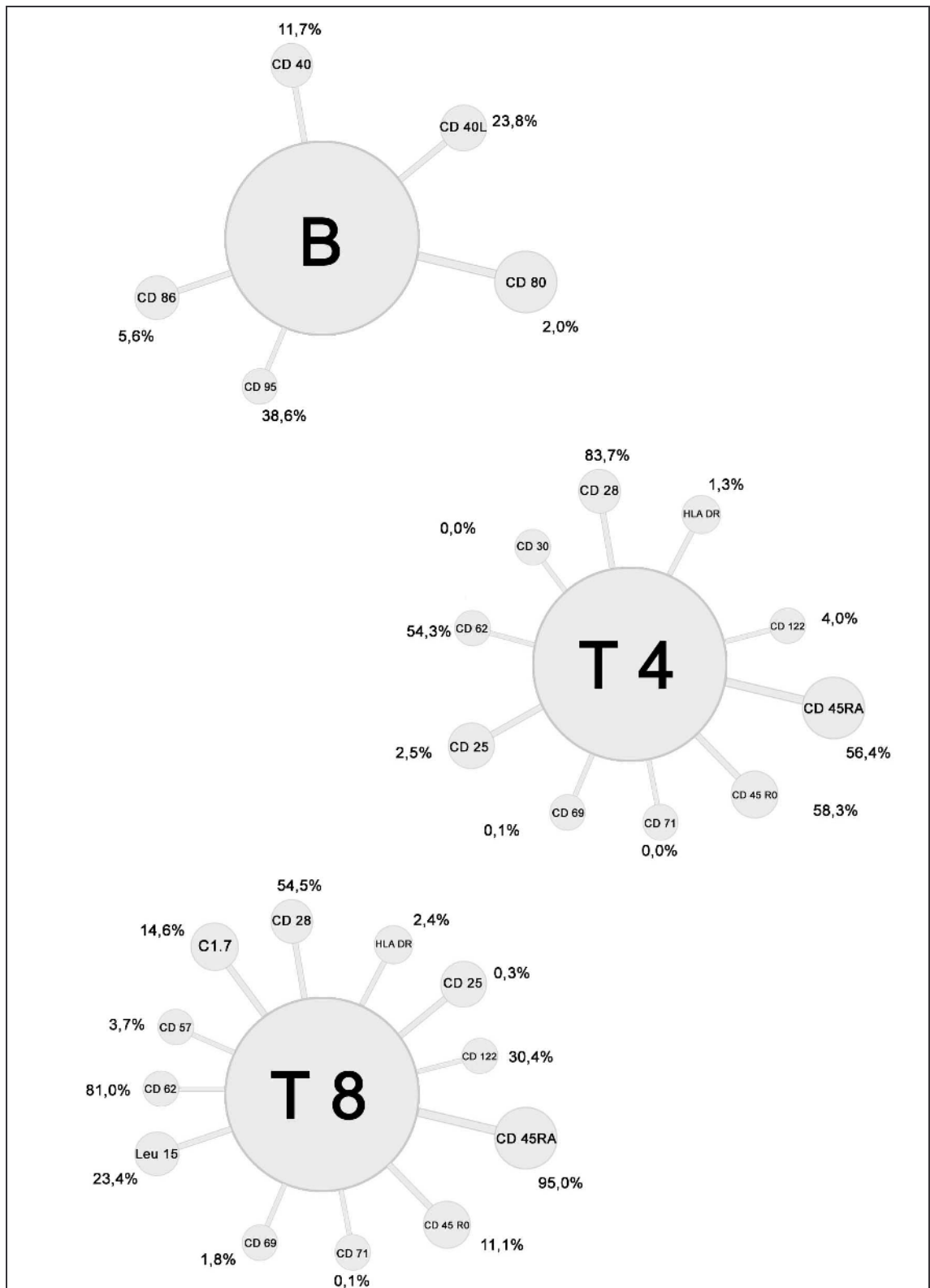


Abbildung 12: Patient 7, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA- und CD45R0-Werte (bei den CD4⁺ und CD8⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%

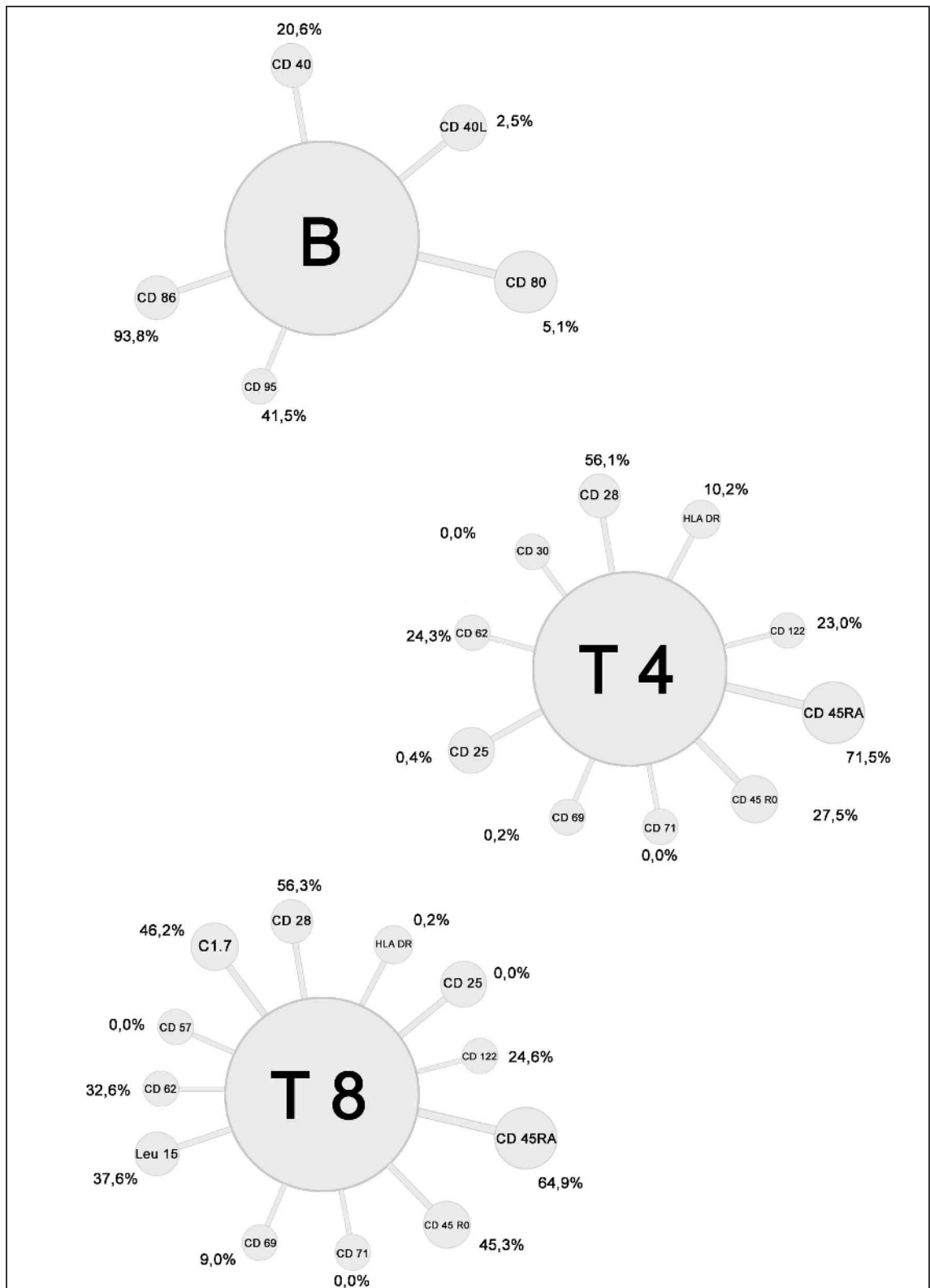


Abbildung 13: Patient 8, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA- und CD45R0-Werte (bei den CD8⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%.

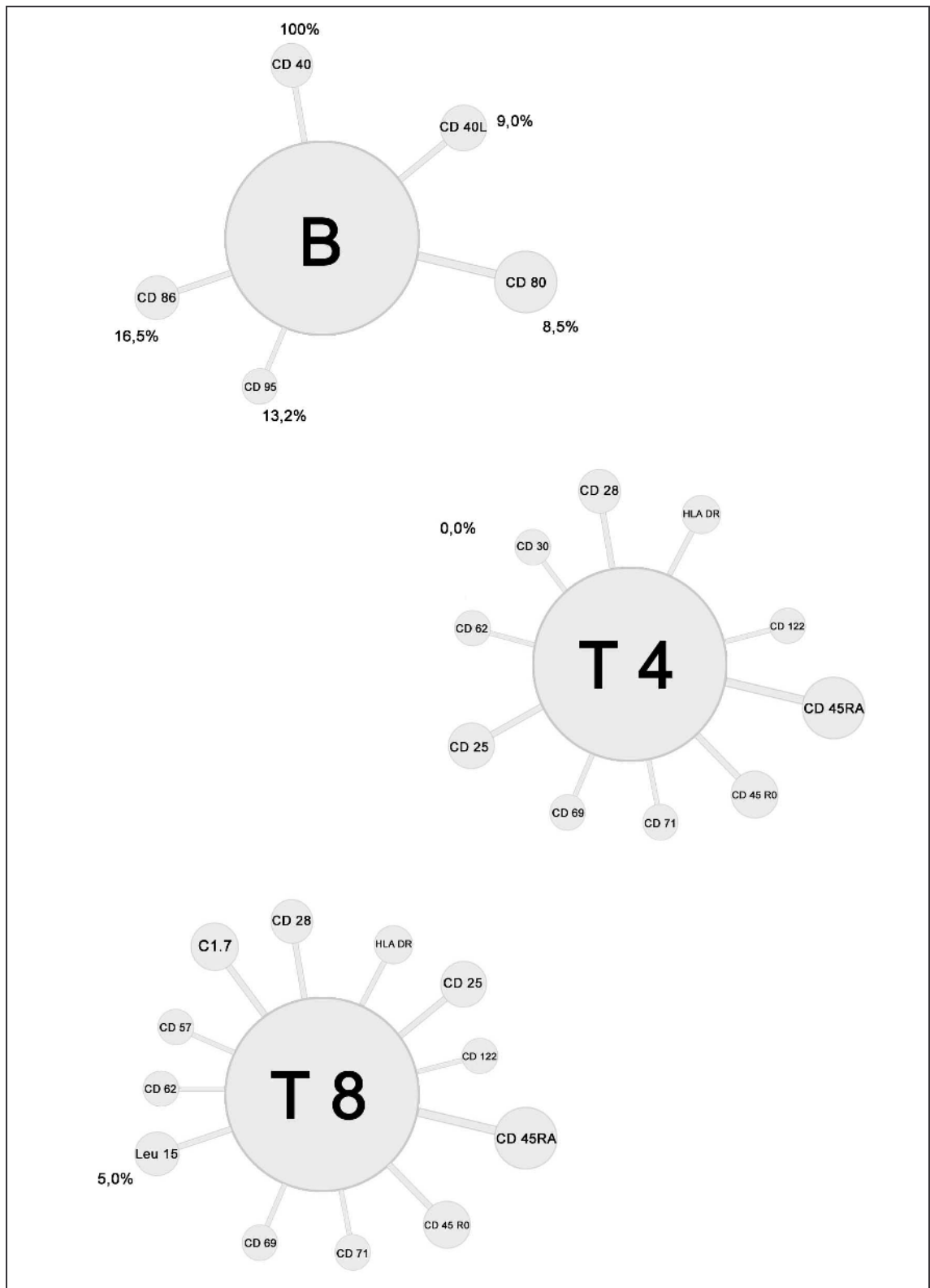


Abbildung 14: Patient 9, Charakterisierung der PMNC. Bei diesem Patienten konnten wegen zu geringer Leukozytenzahlen nur ein geringerer Teil der Oberflächenmarker bestimmt werden.

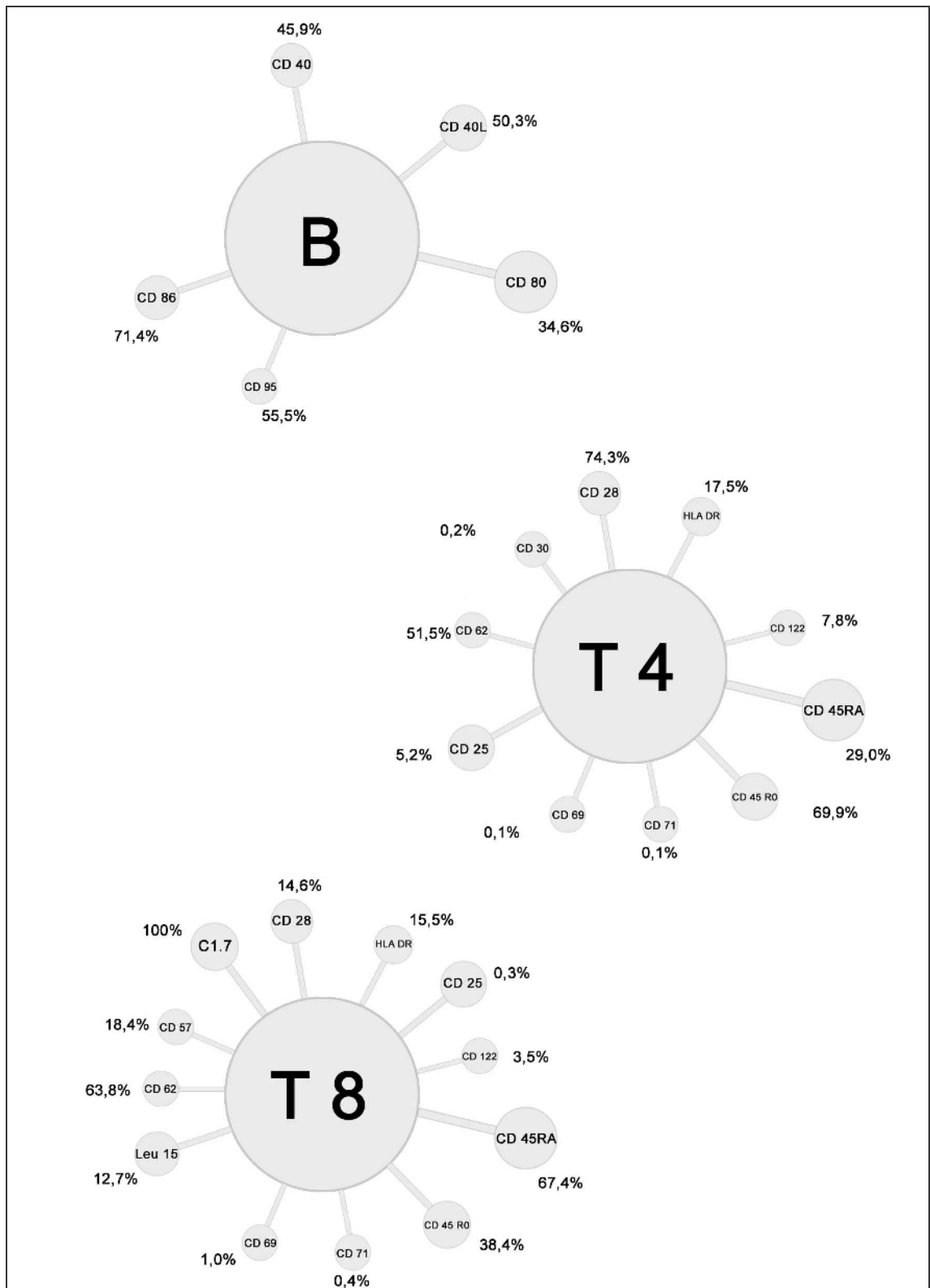


Abbildung 15: Patient 10, Charakterisierung der PMNC.

Bei Patient 11 ist auf den peripheren B-Lymphozyten eine deutlich verminderte CD40-Expression zu sehen (im Vergleich z.B. zu Patient 10, dies als ein Beispiel für die Heterogenität der Patienten/Ergebnisse). Auch die Fas-Rezeptor-Exprimierung ist bei diesem Patienten auf ca. 60% der B-Lymphozyten erhöht. Auf den CD4⁺-Zellen wird CD62, das bereits erwähnte Adhäsionsmolekül, deutlich geringer exprimiert als in den Vergleichspatienten. Bei den CD8⁺-Zellen dieses Patienten ist vor allem die hohe Dichte von CD25 (der p55-Untereinheit des Il-2-Rezeptors) auffällig. Auf nahezu 90% der CD8⁺-Zellen wird CD25 exprimiert (vgl. Abbildung 16). Interessanterweise ist CD122 (die p75 Einheit des Il-2-Rezeptors) nicht mit hochreguliert, sondern eher geringer als im Durchschnitt der übrigen Patienten exprimiert. Die anderen Aktivierungsantigene wie z.B. das frühe Aktivierungsantigen CD69 [70] und der Transferrinrezeptor CD71 auf den CD8⁺-Zellen sind im Vergleich zu den übrigen Patienten bei Patient 11 deutlich hochreguliert. CD57 auf CD8⁺-Zellen konnte bei diesem Patienten wegen nicht ausreichendem Material nicht bestimmt werden.

Die B-Lymphozyten von Patient 12 weisen wie bereits bei einigen anderen Patienten eine im Vergleich zu den anderen Patienten doppelt so hohe CD86- sowie CD40L-Expression auf. CD25 und CD122 waren auf den CD8⁺-Zellen diesmal gleichsinnig herunterreguliert, gegensätzlich hierzu war CD28 deutlich stärker nachweisbar als im Mittel der anderen Patienten (vgl. Abbildung 17).

Die auffälligsten Veränderungen in der Oberflächenantigenzusammensetzung betreffen bei Patient 13 das HLA-DR auf den CD8⁺-Zellen. Dieses ist fast nicht nachweisbar im Vergleich zu einer sonst durchschnittlichen 20%igen Expression bei den anderen Patienten auf dieser Zellart. Ebenfalls sehr wenig exprimiert wird CD25 und CD122, sowie CD62 und C1.7 (jeweils alle auf CD8⁺-Zellen, vgl. Abbildung 18).

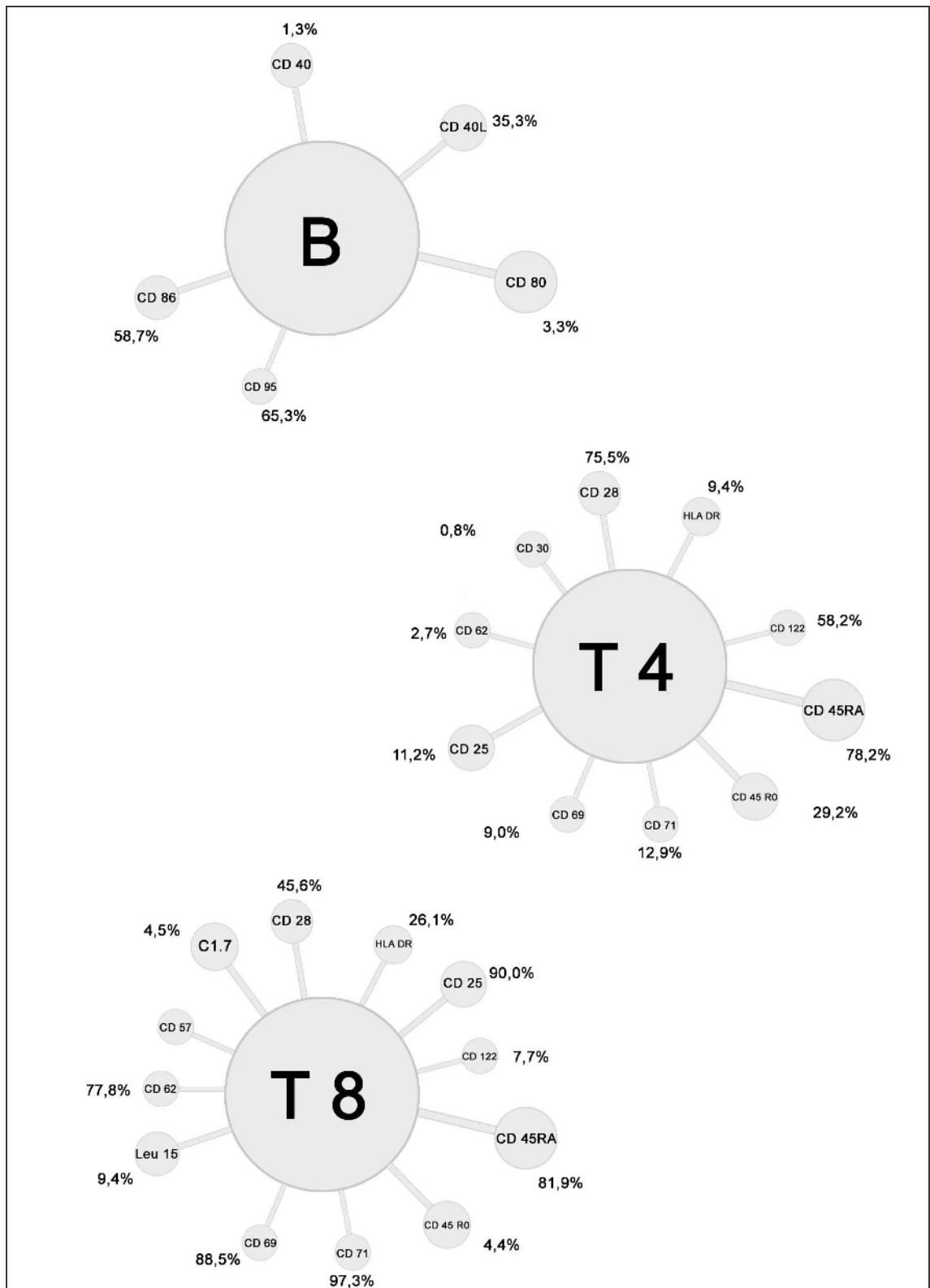


Abbildung 16: Patient 11, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA- und CD45R0-Werte (bei den CD4⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%. CD57 konnte auf Grund von mangelndem Material nicht bestimmt werden.

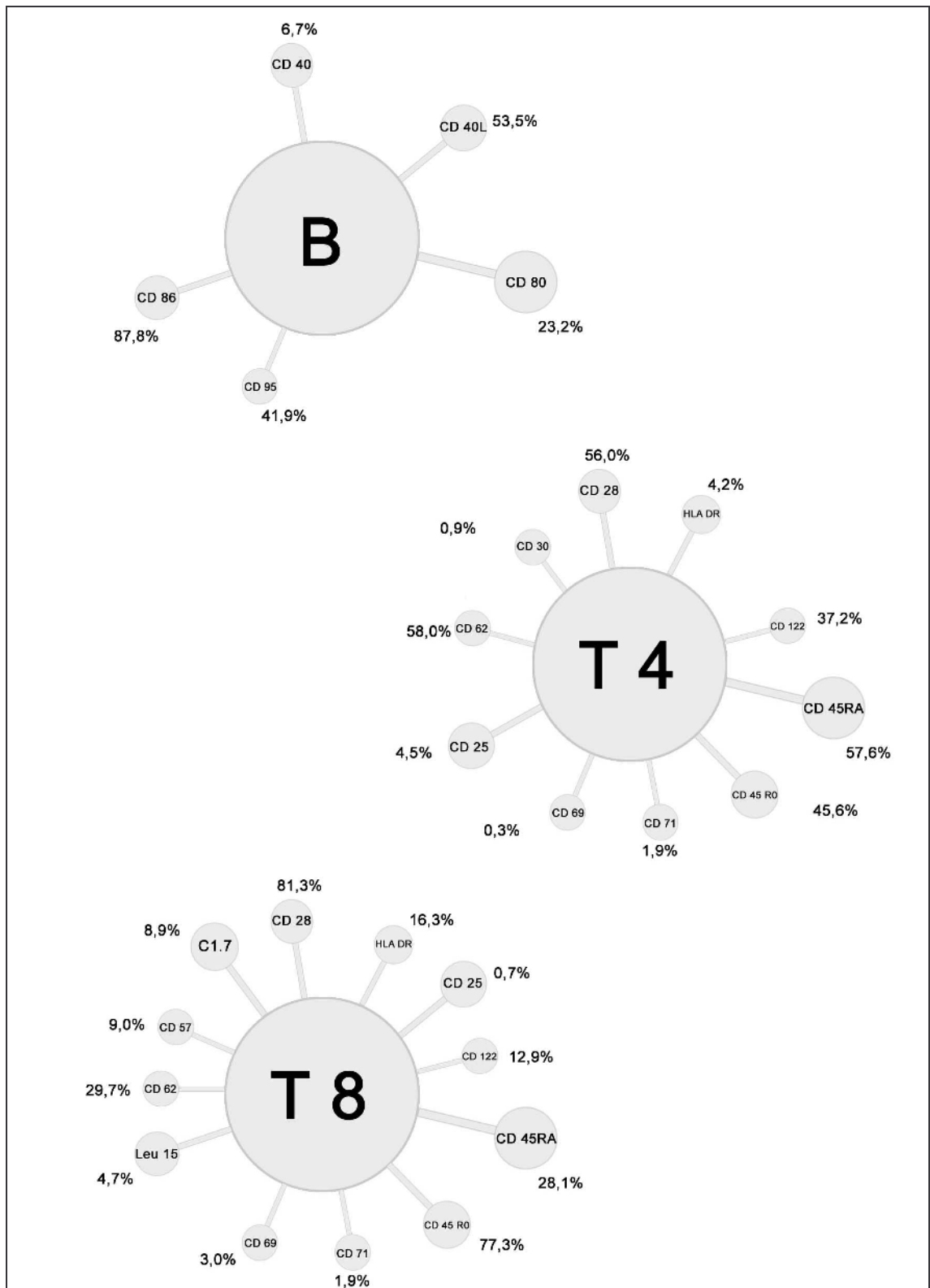


Abbildung 17: Patient 12, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA- und CD45R0-Werte (bei den CD4⁺- und den CD8⁺-Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%.

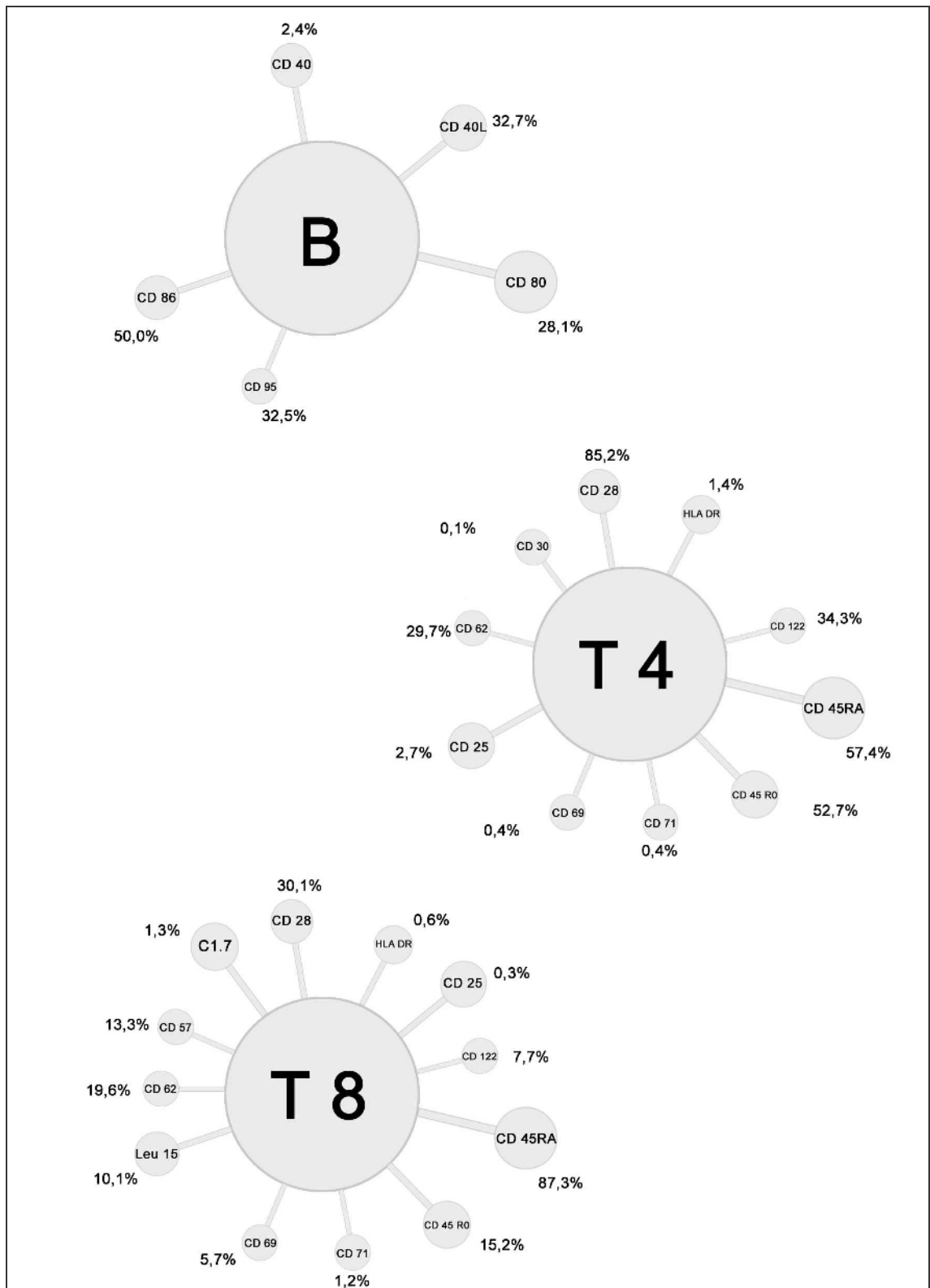


Abbildung 18: Patient 13, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA und CD45R0-Werte (bei den CD4⁺- und den CD8⁺-Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%.

Insgesamt ist die CD4⁺-Population bei den Patienten deutlich homogener als die CD8⁺-Fraktion der PMNC. Hier zeigen sich im Expressionsverhalten fast aller untersuchten Oberflächenantigene große Varianzen, dies lässt indirekt auf eine stärkere Beteiligung dieser Zellgruppe bei der Krankheit bzw. deren Behandlung schließen. Zusammenfassend finden sich in den Tabellen Tabelle 3.8 bis Tabelle 3.10 eine Darstellung der Abweichungen der einzelnen Oberflächenantigen von der Norm.

CD4 ⁺									
Patient Nr	CD25	CD28	CD45RA	CD45RO	CD62	CD69	CD71	CD122	HLA-DR
1	↓↓↓	↑↑↑	↓	↑↑↑	↑	↓↓↓	↓	↑↑↑	↑↑↑
2	↓↓↓	↑↑↑	↓↓↓	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↔	↑↑↑	↑↑↑
3	↓↓↓	↑↑↑	↓	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↓
4	↓↓↓	↑↑↑	↔	↑↑↑	↔	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↔
5	↓↓↓	↑↑↑	↓	↑↑↑	↑	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↑
6	↓↓↓	↑↑↑	↓↓↓	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↑↑↑
7	↓↓↓	↑↑↑	↔	↑↑↑	↔	↓↓↓	↓↓↓	↑	↓
8	↓↓↓	↑↑↑	↔	↔	↓	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↑↑↑
9	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10	↓↓↓	↑↑↑	↓↓↓	↑↑↑	↔	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↑↑↑
11	↑↑↑	↑↑↑	↑	↔	↓↓↓	↓↓↓	↔	↑↑↑	↑↑↑
12	↓↓↓	↑↑↑	↔	↑	↔	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↑
13	↓↓↓	↑↑↑	↔	↑↑↑	↓	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↓

Tabelle 3.8 Regulation von verschiedenen Oberflächenmarkern auf den CD4⁺-Zellen im peripheren Blut der Patienten unter Dauertherapie. Bei Abweichung bis einer StdAbw: ↔, bei Abweichung bis zwei StdAbw.: ↓↓ bzw. ↓, bei mehr als zwei StdAbw: ↓↓↓ bzw. ↑↑↑. Bei Patient 9 lag nicht genügend Material für die Untersuchung der PMNC vor. Für CD30 existieren keine Normalverteilungen für die Expression auf T₄-Zellen, sodass diese nicht aufgeführt wurden. n.b.: nicht bekannt

CD8 ⁺										
Patient Nr	C1.7	Leu15 (CD11b)	CD25	CD28	CD45RO	CD57	CD69	CD7 1	CD122	HLA- DR
1	↓↓↓	↔	↔	↓	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↓	↑	↓
2	↓	↔	↔	↓	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↓	↑	↓
3	↓↓↓	↓	↔	↓	↑	↓↓↓	↓↓↓	↓	↑	↓
4	↓↓↓	↓	↔	↓	↔	↓↓↓	↓↓↓	↓	↑	↓
5	↓	↓	↔	↓	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↓	↑	↔
6	↓↓↓	↓	↔	↑	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↓	↑	↔
7	↓↓↓	↔	↔	↓	↔	↓↓↓	↓↓↓	↓	↑	↓
8	↔	↔	↔	↓	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↓	↑	↓
9	n.b.	↓	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10	↑↑↑	↓	↔	↓	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↓	↔	↔
11	↓↓↓	↓	↑↑↑	↓	↓	n.b.	↔	↑	↔	↑
12	↓↓↓	↓	↔	↑	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↓	↑	↔
13	↓	↓	↔	↓	↔	↓↓↓	↓↓↓	↓	↔	↓

Tabelle 3.9 Regulation von verschiedenen Oberflächenmarkern auf den CD8⁺-Zellen der Patienten unter Dauertherapie. Bei Abweichung bis einer StdAbw: ↔; bei Abweichung bis zwei StdAbw.: ↓ bzw. ↑; bei mehr als zwei StdAbw: ↓↓ bzw. ↑↑. Bei Patient 9 lag nicht genügend Material für die Untersuchung der PMNC vor. Für CD30, CD45RA und CD62L existieren keine Normalverteilungen für die Expression auf T₈-Zellen, sodass diese nicht aufgeführt wurden. n.b.: nicht bekannt

CD20 ⁺				
Patient Nr	CD40	CD80	CD86	CD95
1	↓	↔	↑	↑
2	↓	↓	↑	↑
3	↓	↑	↑	↔
4	↓	↔	↑	↑
5	↓	↓	↓	↓
6	↓	↔	↑	↑
7	↓	↓	↔	↑
8	↓	↓	↑	↑
9	↔	↓	↑	↔
10	↓	↑	↑	↑
11	↓	↓	↑	↑
12	↓	↑	↑	↑
13	↓	↑	↑	↑

Tabelle 3.10 Regulation von verschiedenen Oberflächenmarkern auf peripheren CD20⁺-B-Zellen der untersuchten Patienten unter Dauertherapie. Da hier keine Standardabweichungen vorliegen, wurde bei der Auszeichnung wie folgt vorgegangen: Werte innerhalb der angegebenen Wertebereichen in der Originalpublikation: ↔; abweichend nach oben: ↑; abweichend nach unten: ↓, für CD40L sind keine Normwerte für CD20⁺ veröffentlicht, daher wurde dieser Marker in der Tabelle nicht berücksichtigt.

3.1.3. Charakterisierung der bei Diagnosestellung gewonnenen ALL-Blasten

Vor dem Einsatz in der MLC wurden auch die bei Diagnosestellung eingefrorenen Blasten auf das Vorhandensein von Fas-Rezeptor, den costimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 sowie CD40 und CD40L hin untersucht. Im Durchschnitt waren in jeder Probe 75 % (+/-21) CD19 positive Blasten. Im Mittel liegt die Anzahl der CD40-positiven Blasten bei 73% (+/-37), auffällig sind die niedrigen Werte bei 2 Patienten (7 und 10) mit 8% bzw. 6% CD40-positiven Zellen. Sehr niedrig wird CD40L bei allen untersuchten Proben exprimiert mit 2%(+/-5). Ebenfalls in sehr niedriger Konzentration mit 0,7% (+/-0,8) findet sich CD80 auf den ALL Zellen, im Gegensatz hierzu findet sich die Verteilung von CD86 auf den ALL Zellen in einem Schnitt von 51% (+/-36) mit einer extrem großen Varianz. CD95 kann durchgehend nur in sehr geringer Konzentration, nämlich 0,9% (+/-1) nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 19).

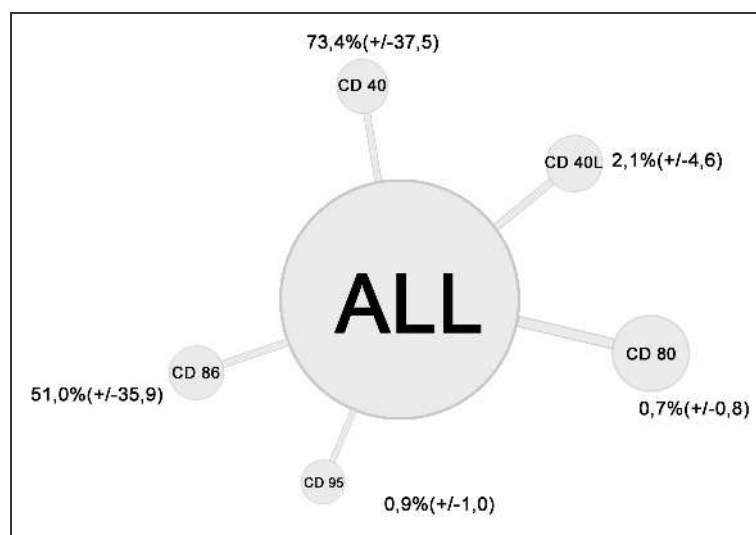


Abbildung 19: Verteilung von Oberflächenantigenen auf den ALL-Zellen der untersuchten Patienten, Zahlen MW (StdAbw).

3.1.4. Charakterisierung der in der MLC eingesetzten PNMC nach der MLC

Um die MLC-Daten bezüglich Apoptose versus Nekrose auswerten zu können, wurden die Zellen nach der Inkubation ebenfalls im FACScan untersucht. Im speziellen wurden die CD3-positiven Zellen nach MLC auf den Einbau von 7-AAD als Maß für die frühe Apoptose (vgl. Kapitel 2.3.7) und mit Hilfe des kommerziellen Testkit Apoptest® auf das Vorhandensein von Apoptose untersucht. Hierbei zeigte sich, dass CD3-positive Zellen ohne Stimulation im Mittel zu 27% (+/-22) mit 7-AAD gefärbt werden können und sich bei der Apoptest-Färbung eine durchgehende Färbung von über 99% ergibt. Im

Vergleich hierzu findet sich für die Stimulation mit den eigenen ALL-Zellen für das frühe Stadium ein ähnliches Bild, jedoch scheinen die Zellen vermehrt in die Apoptose zu gehen, denn 35% (+/-28,8) sind hier bereits 7-AAD positiv (vgl. Tabelle 3.11).

Pat.	CD3 ⁺ (nur MNC eingesetzt, als R und S, Kontrollgruppe)	% davon 7-AAD ⁺	% davon Apoptest ⁺	CD3 ⁺ (MNC als Responder R, ALL als Stimulatoren S)	% davon 7-AAD ⁺	% davon Apoptest ⁺
3	14,2	50,7	99,8	13,3	87,5	99,8
4	8,0	11,7	98,5	13,9	2,3	96,4
5	5,0	4,9	100,0	20,3	1,2	96,4
7	93,9	2,6	99,6	95,3	41,2	100,0
8	76,4	16,8	99,9	44,2	20,6	99,8
9	67,2	19,0	99,5	72,5	24,0	99,8
12	12,1	48,5	98,7	15,4	33,5	99,9
13	5,5	63,4	99,1	9,6	71,1	99,3
MW	35,3	27,2	99,4	35,6	35,2	98,9
StdAbw	37,2	23,4	0,6	32,3	28,8	1,6

Tabelle 3.11 Apoptest /7-AAD- Untersuchungen post MLC. Nur bei einem Teil der Patienten war post-MLC genügend Material zur Durchführung der Untersuchungen vorhanden. MW: Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung. Linke Spalten: Kultur nur der MNC (R und S); rechte Spalten: Kultur MNC (R) + ALL (S)

Vergleichend hierzu wurden ALL-Zellen mit bestrahlten MNC inkubiert. Hier zeigte sich, dass die CD19⁺-Zellen zu 70% (+/-24) apoptotisch waren, der Nullwert ohne Stimulation betrug ebenfalls 77%(+/-21) (vgl. Tabelle 3.12). Hier fanden sich bei der statistischen Analyse signifikante ($p < 0,02$) Unterschiede zu den Ergebnissen der bestrahlten ALL-Zellen. Ebenfalls wurde die Nekroserate der CD3-positiven Zellen getestet, sie entspricht einer positiven Propidiumjodidaufnahme. Im Mittel sind es 25% (+/-21) CD3⁺-Zellen unter Stimulation mit eigenen ALL-Zellen (vgl. Tabelle 3.13), die nekrotisch werden. Dieser Wert steigt unter allogener Stimulation auf 38%(+/-32).

Pat.	CD19 ⁺ (nur ALL-Zellen eingesetzt als R und S)	% davon 7AAD ⁺	CD19 (ALL als Responder R, MNC als Stimulatoren S)	% davon 7AAD ⁺
3	6,0	85,8	13,7	92,4
4	2,9	36,9	2,1	90,4
5	2,8	52,7	2,0	51,1
7	70,5	95,9	91,4	89,2
8	69,6	70,5	37,4	83,6
9	66,4	88,7	29,2	19,8
12	62,2	97,4	13,2	53,7
13	84,5	92,8	10,2	85,5
MW	45,6	77,6	24,9	70,7
StdAbw	35,1	22,3	29,6	26,3

Tabelle 3.12 7-AAD-Untersuchungen an CD19⁺ ALL-Zellen post MLC. Nur bei einem Teil der Patienten war post-MLC genügend Material zur Durchführung der Untersuchungen vorhanden (MW: Mittelwert, StdAbw.: Standardabweichung). Linke Spalte: nur ALL-Zellen als R und S eingesetzt, rechte Spalte ALL-Zellen als Responder (R) eingesetzt und MNC als Stimulatoren (S)

Pat.	CD3 ⁺ (MNC als R, dem Patienten zugehörige ALL-Zellen als S)	% davon PI ⁺	CD3 ⁺ (MNC als R, fremde, nicht dem Patienten zugehörige ALL-Zellen als S)	% davon PI ⁺
7	93,1	11,4	93,1	16,1
8	40,4	8,0	40,4	80,9
9	89,1	11,4	89,1	1,9
12	10,9	30,6	10,9	30,1
13	6,1	63,1	6,1	60,2
MW	47,9	24,9	47,9	37,8
StdAbw	41,6	23,1	41,6	32,3

Tabelle 3.13 Propidiumjodid-Untersuchung auf Membranbeständigkeit post MLC. Nur bei einem Teil der Patienten war post-MLC genügend Material zur Durchführung der Untersuchungen vorhanden (MW: Mittelwert, StdAbw.: Standardabweichung). Linke Spalten: Nachweis von CD3⁺ Zellen bei Cokultur von MNC des Patienten (R) mit eigenen, dem Patienten zugehörige ALL-Zellen als Stimulatoren (S). Rechte Spalten: Nachweis von CD3⁺ Zellen bei Cokultur von MNC (R) des Patienten mit fremden, nicht dem Patienten zugehörige ALL-Zellen als Stimulatoren (S)

3.1.5. Ergebnisse und Auswertung der Proliferationsuntersuchungen in der MLC von MNC mit autologen und allogenen ALL-Zellen

Im Mittel zeigte sich bei der Proliferation der Patienten-PMNC gegen fremde Zellen ein Proliferationsindex (Verhältnis der BrdU-Anreicherung mit Stimulation zu der BrdU-Anreicherung ohne Stimulation) von 9,52 (+/-16,71), d.h. allogene Zellen stimulierten 9,5mal stärker als eigene Zellen. Im Gegensatz hierzu proliferierten die MNC der Patienten gegen die eigenen ALL-Zellen weitaus geringer, nämlich mit einem Proliferationsindex von 1,76 (+/-1,13)(vgl Tabelle 3.14). Ebenso war die Proliferation gegen die Zelllinien 207 und 697 auch gegen fremde ALL-Zellen deutlich höher, nämlich 32,76 (+/-61,1), 27,84 (+/-46,6) und 4,51 (+/-8,35). Die Kontrollen verhielten sich ähnlich, zeigten aber gegenüber den ALL-Zellen der Patienten eine deutlich stärkere Proliferation von 8,65 (+/-15,1), (vgl. Tabelle 3.15). Eine statistische Signifikanz obiger Unterschiede ließ sich jedoch nicht nachweisen.

Patienten	Nullwert: Inkubation von MNC als Responder (R1) und Stimulator (S1)	R:MNC vs. S2: allogene MNC von gesunden Kontrollkindern	R:MNC vs. S3: autologe ALL-Zellen	R:MNC vs. S4: Zelllinie 207	R:MNC vs. S5: Zelllinie 697	R:MNC vs. S6: allogene ALL
1	1	0,6	2,4	13,9	12,6	32,0
2	1	1,1	1,4	0,0	6,1	1,9
3	1	13,5	3,1	69,5	21,5	2,4
4	1	1,5	0,2	18,7	11,5	1,6
5	1	1,2	0,4	8,0	7,0	0,6
6	1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
7	1	62,6	0,9	223,2	176,8	2,8
8	1	14,3	1,6	48,9	38,0	2,5
9	1	2,3	1,5	3,9	4,0	0,4
10	1	10,4	3,7	5,1	41,2	1,5
11	1	1,8	3,3	0,3	4,8	3,3
12	1	3,5	2,0	0,4	8,1	1,5
13	1	1,6	0,5	1,2	2,4	3,6
MW	1,0	9,5	1,8	32,8	27,8	4,5
StdAbw	0,0	16,7	1,1	61,1	46,6	8,4

Tabelle 3.14 Proliferationsindizes der Patienten (R1) in der MLC, BRDU-ELISA, MW Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung. R1: Responder (unbestrahlte Zellen) des Patienten, S. Stimulator (bestrahlte Zellen), S1: Patient, S2: gesunde Kontrolle, eigene ALL, S4: Zelllinie 207, S5 Zelllinie 697, S6: fremde ALL, n.b. nicht bekannt

Kontrollen	Nullwert: Inkubation von MNC als Responder (R) und Stimulator (S2), MNC von gesunden Kontrollkindern	R:MNC vs. S1: allogene MNC von Patienten	R:MNC vs. S3: allogene ALL-Zellen	R:MNC vs. S4: Zelllinie 207	R:MNC vs. S5: Zelllinie 697	R:MNC vs. S6: allogene ALL
1	1	0,6	4,3	7,8	4,6	0,1
2	1	0,3	0,3	16,8	10,0	2,6
3	1	4,2	3,6	14,1	7,0	2,2
4	1	6,2	2,0	5,8	5,4	2,9
5	1	6,2	2,0	5,8	5,4	2,9
6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
7	1	32,3	4,8	271,8	183,7	1,7
8	1	16,9	0,8	29,0	22,8	0,6
9	1	29,4	48,4	52,8	48,6	5,4
10	1	1,8	0,8	1,0	9,8	7,0
11	1	31,8	35,3	2,2	38,9	11,9
12	1	0,5	1,2	0,1	2,0	0,4
13	1	4,3	0,3	0,1	17,2	4,8
MW	1,0	11,2	8,7	33,9	29,6	3,5
SW	0,0	12,3	15,2	73,2	48,5	3,2

Tabelle 3.15 Proliferationsindices der Kontrollen (R2) in der MLC, BRDU-ELISA, MW: Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung.
R2: Responder (unbestrahlte Zellen) der gesunden Kontrolle, S. Stimulator (bestrahlte Zellen), S1: Patient, S2: gesunde Kontrolle,
S3: ALL-Zellen des Patienten, S4: Zelllinie 207, S5 Zelllinie 697, S6: fremde ALL, n.b. nicht bekannt

3.1.6. Ergebnisse und Auswertung der Apoptose-Untersuchungen nach der MLC von MNC mit autologen und allogenen ALL-Zellen mit dem Cell-Death-Detection-ELISA

Bei der Auswertung der Apoptose-ELISAs fanden sich ähnliche Ergebnisse wie bei den Proliferationstests. Der Grad der Apoptose (definiert als Verhältnis der Apoptosewerte bei Stimulation zu den Werten ohne Stimulation) lag bei Inkubation zusammen mit fremden Zellen im Mittel bei 7,56 (+/-17,3), bei Inkubation mit den eigenen ALL-Zellen bei 8,15 (+/-20,5) und bei fremden ALL-Zellen bei 37,9 (+/-120,7). Bei der Stimulation mit den Zelllinien 207 und 697 ergaben sich Apoptoseindices von 67,2 (+/-211,8) und 1,31 (+/-2,68)(vgl. Tabelle 3.16). Bei den Kontrollen wurden homogenere Werte gemessen. Es zeigte sich eine leicht erhöhte Apoptoseneigung bei Stimulation mit den MNC der Patienten sowie mit den ALL-Zellen und der Zelllinie 207: 1,2 (+/-0,8), 1,5 (+/-0,9), 1,8 (+/-1,1) ohne signifikanten Unterschied zur Patientengruppe. Niedrigere Apoptosewerte fanden sich bei Stimulation mit der Zelllinie 697: 0,7 (+/-0,7), auch hier ohne signifikanten Unterschiede zu der Patientengruppe (vgl. Tabelle 3.17).

Patienten	Nullwert: Inkubation von MNC als Responder (R1) und Stimulator (S1)	R:MNC vs. S2: allogene MNC von gesunden Kontrollkindern	R:MNC vs. S3: autologe ALL-Zellen	R:MNC vs. S4: Zelllinie 207	R:MNC vs. S5: Zelllinie 697	R:MNC vs. S6: allogene ALL
1	1	2,8	3,4	0,6	0,6	1,8
2	1	2,3	1,3	0,7	0,5	2,2
3	1	1,1	0,9	2,6	0,3	0,4
4	1	0,7	0,4	0,2	0,2	0,3
5	1	1,0	1,7	0,6	0,9	0,1
6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
7	1	9,7	11,2	23,0	2,2	5,5
8	1	1,2	1,2	1,6	0,4	2,0
9	1	1,0	0,7	0,5	0,5	0,6
10	1	64,5	75,5	769,5	10,0	438,0
11	1	4,2	0,5	3,4	0,0	2,5
12	1	0,9	0,5	1,6	0,1	0,2
13	1	1,4	0,5	1,9	0,1	0,6
MW	1,0	7,6	8,2	67,2	1,3	37,9
StdAbw	0,0	17,3	20,5	211,8	2,7	120,7

Tabelle 3.16 Apoptoseindices der Patienten (R1) in der MLC, CDDE-ELISA, MW: Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung. R1: Responder (unbestrahlte Zellen) des Patienten, S. Stimulator (bestrahlte Zellen), S1: Patient, S2: gesunde Kontrolle, S3: eigene ALL, S4: Zelllinie 207, S5 Zelllinie 697, S6: fremde ALL, n.b. nicht bekannt

Kontrollen	Nullwert: Inkubation von MNC von gesunden Kontrollkindern als Responder (R) und Stimulator (S2)	R:MNC vs. S1: allogene MNC von Patienten	R:MNC vs. S3: allogene ALL-Zellen	R:MNC vs. S4: Zelllinie 207	R:MNC vs. S5: Zelllinie 697	R:MNC vs. S6: allogene ALL
1	1	0,9	1,6	0,6	0,3	0,9
2	1	0,7	0,8	1,1	0,2	1,4
3	1	0,7	1,2	1,7	0,2	0,3
4	1	2,5	1,8	0,7	0,5	1,0
5	1	0,7	0,6	0,7	1,0	1,0
6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
7	1	1,2	2,6	2,3	2,0	1,4
8	1	3,3	3,4	3,1	2,5	2,5
9	1	1,1	0,7	0,6	0,4	0,6
10	1	0,4	1,4	2,1	1,1	1,7
11	1	0,6	2,2	4,3	0,3	1,5
12	1	1,1	1,0	2,3	0,2	0,6
13	1	1,2	0,5	2,0	0,2	0,7
MW	1,0	1,2	1,5	1,8	0,7	1,1
StdAbw	0,0	0,8	0,9	1,1	0,7	0,6

Tabelle 3.17 Apoptoseindices der Kontrollen (R2) in der MLC, CDDE-ELISA, MWW Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung. R2: Responder (unbestrahlte Zellen) der gesunden Kontrolle. S. Stimulator (bestrahlte Zellen), S1: Patient S2: gesunde Kontrolle, S3: ALL-Zellen des Patienten, S4: Zelllinie 207, Apoptoseindices der Kontrollen (R2) in der MLC, CDDE-ELISA, S5 Zelllinie 697, S6: fremde ALL, n.b. nicht bekannt

3.1.7. rT-PCR nach MLC aus der MLC von MNC der Patienten mit autologen ALL-Zellen als Stimulatoren

Die durchgeführten Untersuchungen (vgl. Kapitel 2.3.8) zum Nachweis von mRNA bestimmter Aktivierungs-, Proliferations- und Apoptoseproteine wurden nur bei den ersten vier Patienten durchgeführt. Es konnten sowohl vor als auch nach MLC bei positiver β -Aktin-Probe die m-RNA der folgenden Proteine nachgewiesen werden: CD2, CD19, TiA, Granzyme A, Granzyme B, Fas-Ligand, Perforin, CD95/Fas. Ein Nachweis von Interleukin 2 und TNF- β gelang in keiner der Proben. Eine genaue Auflistung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 3.18.

Nr		β -Aktin	CD3	CD19	TiA	Gr A	Gr B	FasL	Perf	CD95/Fas	Il-2	TNF β
1	Vor MLC	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	nach MLC	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
2	Vor MLC	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	nach MLC	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
4	Vor MLC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	nach MLC	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
5	vor MLC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	nach MLC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Tabelle 3.18 Ergebnisse der RT-PCR: Nachweis von verschiedenen m-RNA bestimmter Signal- bzw. zellspezifischer Proteine. β -Aktin: positiv-Kontrolle für den Nachweis von RNA und die erfolgreiche Umschreibung in cDNA, mit + ist der positive Nachweis markiert, mit - kein Signal. TiA: T-cell intracellular antigen, Gr A: Granzyme A, Gr B: Granzyme B, FasL: Fas-Ligand, Perf: Perforin, Apo: CD95/Fas, TNF β : Tumor Nekrose Faktor β .

3.2. Korrelationen

Die vorhandenen Daten wurden systematisch auf mögliche vorhandene Zusammenhänge getestet, signifikante Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt erläutert und sind in Tabelle 3.19, Tabelle 3.20 und Tabelle 3.21 zusammengefasst.

Art	Korrelationskoeffizient r	Signifikanz p	Test
T4: CD45RA ⁺ vs CD45R0 ⁺	-0.964	<0,01	Spearman
T8: CD45 RA ⁺ vs CD45R0 ⁺	-0.916	<0,01	Spearman
T4 CD71 ⁺ vs T8 CD122 ⁺	0.813	<0,01	Pearson
TCR γ/δ vs. CD3 ⁺	-0.782	<0,01	Spearman
T 4 vs TCR γ/δ	-0.766	<0,01	Pearson
T 8 vs TCR γ/δ	-0.636	<0,05	Spearman
CD28 ⁺ auf T4-Zellen vs CD86 ⁺ auf verbliebenen B-Zellen	-0.661	<0,05	Spearman
CD86 ⁺ auf ALL-Zellen vs CD28 ⁺ auf T ₈ -Zellen	0.818	<0,01	Spearman
CD80 ⁺ auf ALL-Zellen vs CD28 ⁺ auf T ₄ -Zellen	-0.656	<0,05	Pearson

Tabelle 3.19 Zusammenfassende signifikante Korrelationen mit Testverfahren, Bereich der Verteilung von Oberflächenmarkern auf den MNC während der Dauertherapie

Art	Korrelationskoeffizient r	Signifikanz p	Test
Anteil von T4 vs. Proliferation gegen eigene ALL	-0.776	<0,01	Spearman
T4:T8-Quotient vs. Proliferation gegen eigene ALL	0.926	<0,01	Pearson
T4:T8-Quotient vs. Apoptose bei eigener ALL	0.936	<0,01	Pearson
Anteil CD86 ⁺ ALL-Zellen vs. Proliferation gegen eigene ALL	0.671	<0,05	Spearman

Tabelle 3.20 Zusammenfassung Korrelation: Zusammenhang zwischen MLC-Proliferation/Apoptose mit Oberflächenmarkern der MNC während der Dauertherapie

Art	Korrelationskoeffizient r	Signifikanz p	Test
TCR γ/δ vs CD80 auf ALL-Zellen	0.782	<0,01	Pearson
CD45 RA auf T4 Zellen vs. CD80 auf ALL-Zellen	0.821	<0,01	Spearman
CD45 R0 auf T4 Zellen vs. CD80 auf ALL-Zellen	-0.839	<0,01	Spearman
CD28 auf T4 Zellen vs. CD80 auf ALL-Zellen	-656	<0,05	Pearson

Tabelle 3.21 Korrelationen zwischen MNC während der Dauertherapie und autologen ALL-Zellen

Die Anzahl von CD71 auf CD4⁺-Zellen korreliert signifikant positiv mit der Konzentration von CD122 auf den CD8⁺-Zellen (p<0,01). Wie zu erwarten korrelieren die Werte für CD45RA und CD45R0 negativ sowohl bei den CD4⁺- als auch bei den CD8⁺-Zellen (p<0,01; vgl. Abbildung 20).

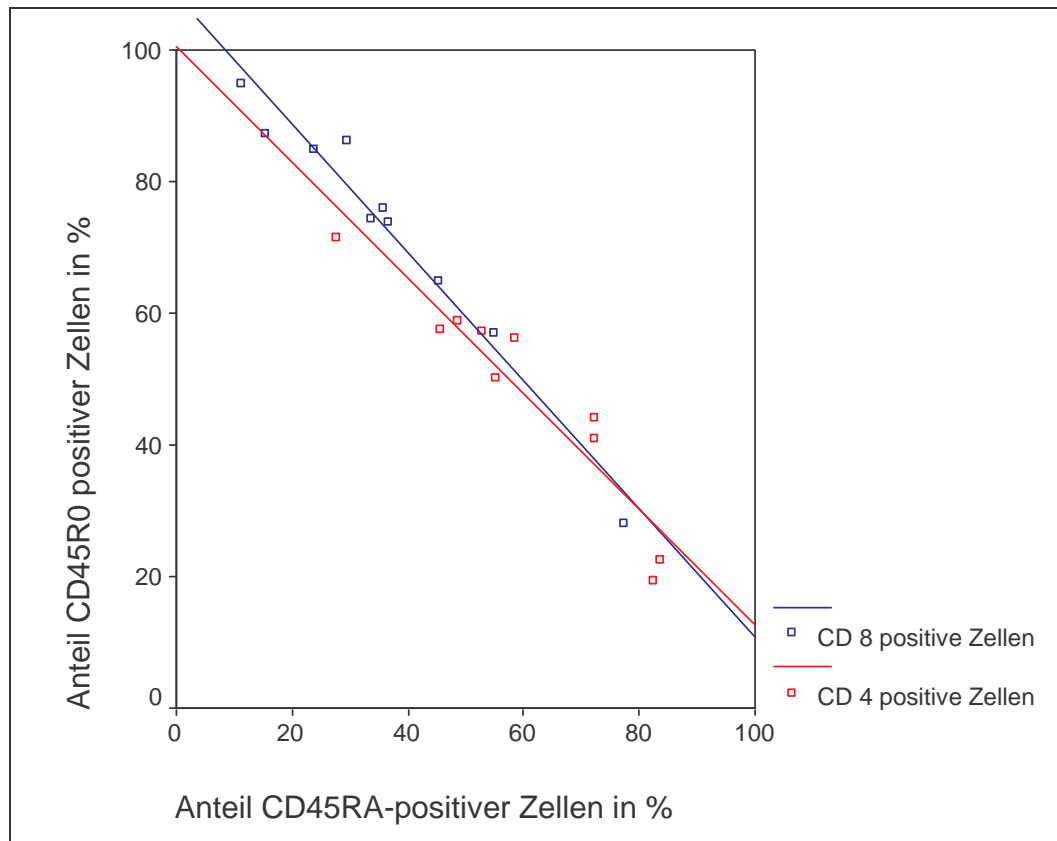


Abbildung 20: Korrelation zwischen RA- und R0-Anteil des CD45 auf T₄ und T₈-Zellen

Eine Korrelation zwischen TCR α/β zu TCR γ/δ existiert nicht ($p=0,25$), jedoch zeigt sich ein negativer linearer Zusammenhang zwischen der TCR γ/δ -Expression und mit der Gesamtzahl der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen (vgl. Abbildung 21) und auch dem Verhältnis von CD28⁺/CD4⁺-Zellen ($p<0,01$).

Positiv korreliert die TCR γ/δ -Expression mit der CD16/56-Expression, d.h. dass vor allem die NK-Zellen diesen T-Zell-Rezeptortyp ($p<0,01$) exprimieren. Umgekehrt gilt, dass die TCR γ/δ -Expression negativ mit der CD16/56-Expression korreliert ($p<0,05$).

Ebenso zeigt sich kein Zusammenhang zwischen der CD25- und CD122-Expression sowohl bei CD4⁺ als auch bei CD8⁺ Zellen ($p=0,7$ und $p=0,19$). Eine negative Korrelation besteht zwischen der CD28 Expression auf den CD4⁺ Zellen und der CD80 Expression auf den CD19⁺-ALL-Zellen ($p<0,05$). Die CD86⁺-CD19⁺-Expression auf den ALL-Zellen korreliert jedoch positiv mit der CD28 Expression auf den CD8⁺ Zellen (vgl. Abbildung 22).

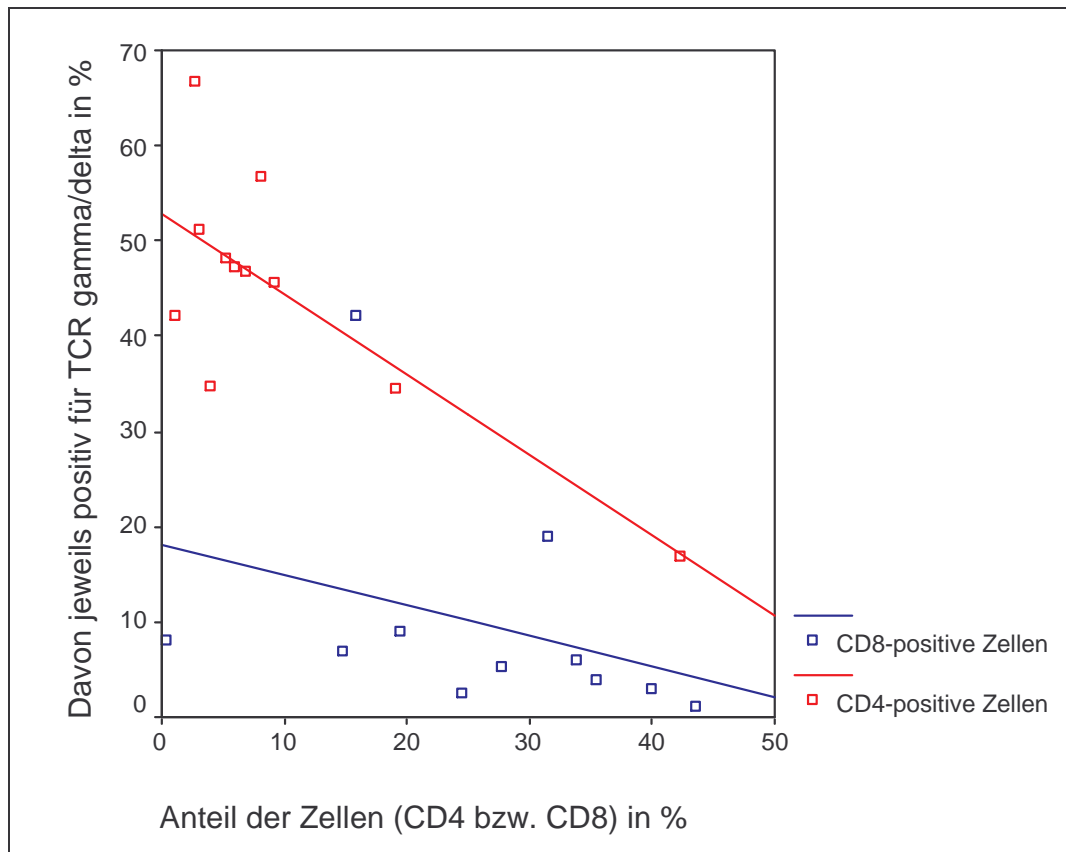


Abbildung 21: Der Anteil der TCR γ/δ -positiven Zellen sinkt mit der relativen Anzahl von T₄ und T₈-Lymphozyten.

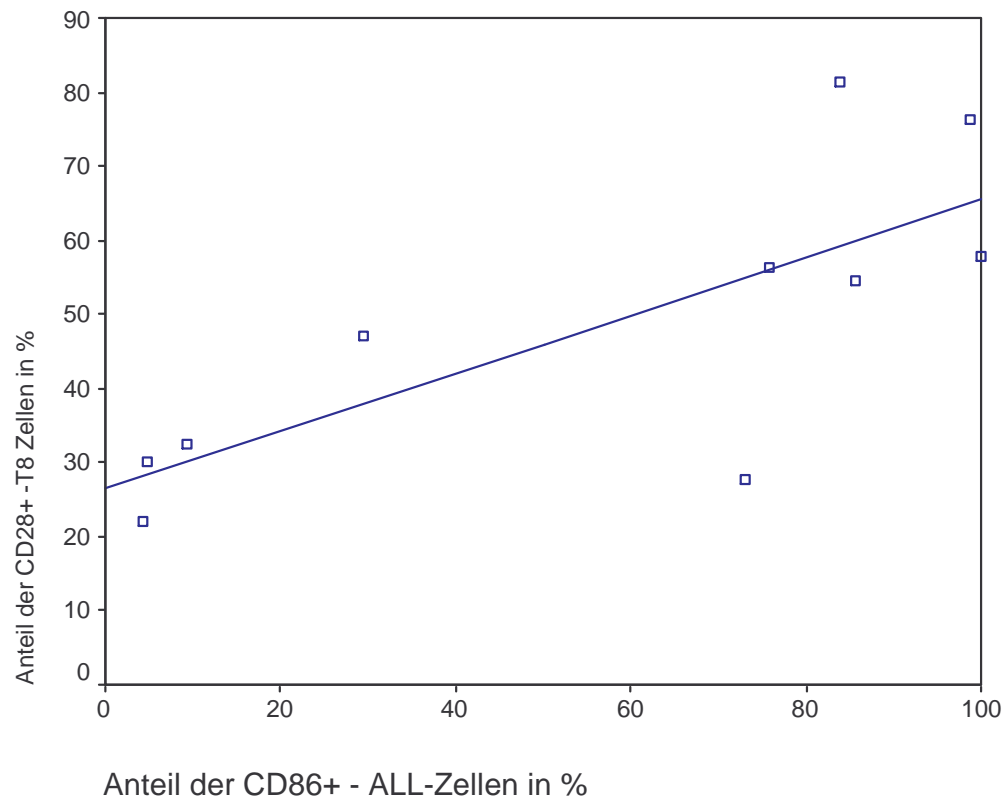


Abbildung 22: Je mehr CD86 auf den ALL-Zellen der Patienten exprimiert wird, desto höher ist der Anteil der CD28-positiven T₈-Zellen.

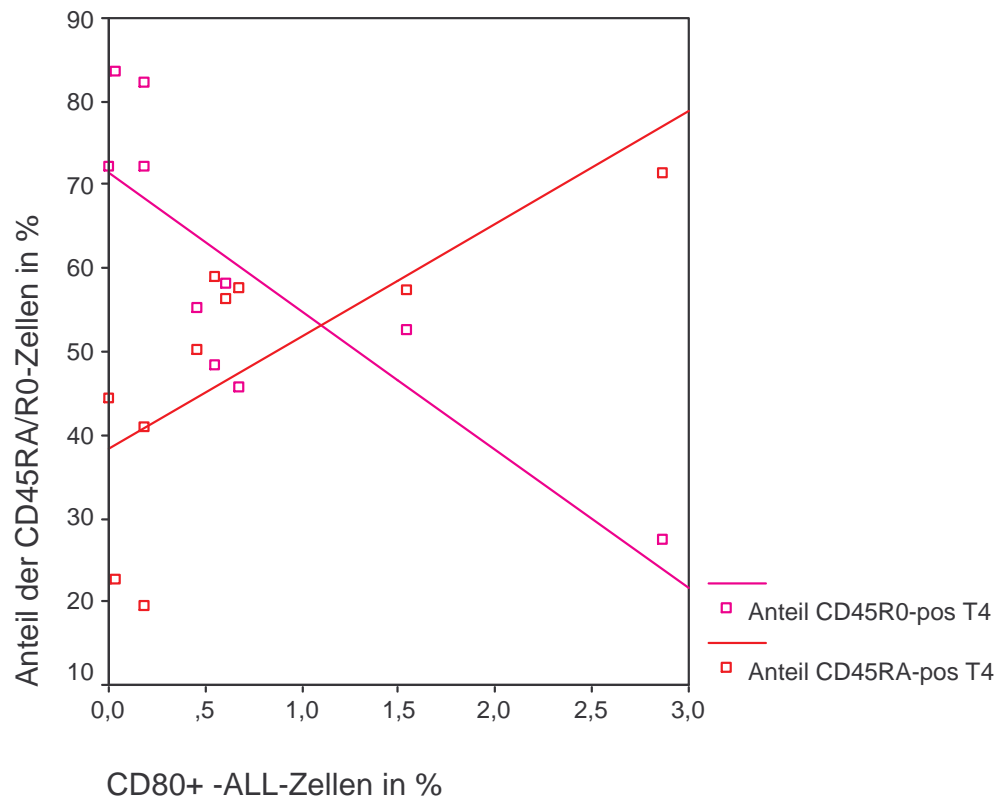


Abbildung 23: Zusammenhang zwischen der Expression von CD45 RA bzw. R0, also der „Reifung“ von T-Zellen während der Dauertherapie und der Expression von CD80 auf den ALL-Zellen.

Bei der Betrachtung der ELISAs der durchgeführten Apoptose- und Proliferations-experimente findet sich eine negative Korrelation zwischen der Anzahl der $CD4^+$ -Zellen und der Proliferation gegen die eigenen ALL-Zellen, d.h. je niedriger die Zahl der T_4 -Zellen ist desto stärker die Proliferation ($p < 0,05$). Ebenfalls gilt:

Je höher das Verhältnis $T_4:T_8$ -Zellen, desto stärker proliferieren die Patientenzellen gegen fremde Zellen ($p < 0,01$) und desto höher ist der Apoptoseindex gegen eigene ALL-Zellen ($p < 0,01$, Abbildung 24). Bei dem Verhältnis von CD86-Expression auf den ALL-Zellen existiert eine positive Korrelation mit der Proliferationstendenz im BrdU-ELISA, d.h. je niedriger die CD86-Expression, desto stärker ist die Proliferation ($p < 0,05$).

Bei der weiteren Untersuchung der ALL-Zellen zeigt sich ein enger Zusammenhang zwischen der Expression des T-Zell Rezeptors γ/δ auf den MNC und dem Auftreten von CD80 auf den ALL-Zellen ($p < 0,01$). Positiv korreliert mit dem Auftreten von CD80 auf den ALL-Zellen ist die Expression von naiven $CD45RA^+$ - T_4 -Zellen ($p < 0,05$), negativ

korreliert dagegen das Auftreten geprägter CD45R0⁺-T₄-Zellen ($p < 0,01$; Abbildung 23). Auch die Expression von CD28 auf den T₄-Zellen ist negativ korreliert mit der CD80-Expression auf den ALL-Zellen der Patienten ($p < 0,05$).

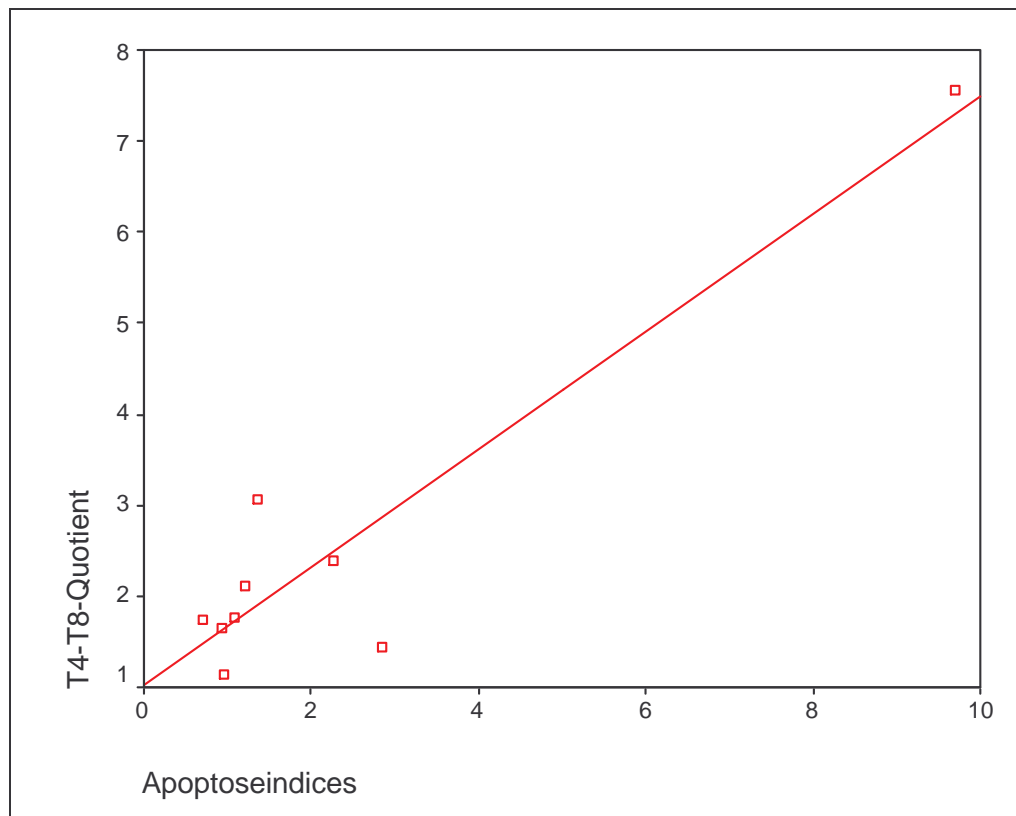


Abbildung 24: Zusammenhang von Apoptoseindices und T4/T8-Quotient, $r=0,94$, $p < 0.01$: Je höher der T4/T8-Quotient desto stärker ist die Apoptose bei der Co-Inkubation von MNC des Patienten mit der eigenen ALL.

4. Diskussion

4.1. Einordnung der phänotypischen Untersuchungen von Oberflächenmarkern von PMNC's in der Dauertherapie

Die Interpretation der gewonnenen FACS-Ergebnisse orientiert sich zum einen an umfangreichen Untersuchungen zur altersentsprechenden Entwicklung von Lymphozytenoberflächenantigenen [15, 32, 81], zum anderen an Einzeluntersuchungen zu bestimmten Markern. Soweit vorhanden, wurden altersspezifische Veröffentlichungen herangezogen, um der Entwicklung der Antigene im Kindesalter Rechnung zu tragen. Die Anzahl der CD3⁺-Zellen mit im Mittel 67 % entspricht den Normwerten für Kinder in der Altersgruppe der Patienten. Sie werden mit 66% +/- 8,2 % [81] angegeben, d.h. dass sich die Patienten nur in der Varianz der Ergebnisse von gesunden Kindern unterscheiden. Bei der Verteilung des T-Zell-Rezeptortyps finden sich große individuelle Unterschiede in der Expression der verschiedenen T-Zell-Rezeptoren. Da die Expression von TCR γ/δ im Thymus sowohl als eine eigenständige Linie [7], als auch als eine Art „Brücke“ beim Ausfall der Bildung des TCR α/β dienen kann [12] und Normwerte für die Verteilung peripherer T-Zellen mit TCR γ/δ -Expression bei Kindern fehlen, ist die Interpretation der Daten sehr schwierig. So wurde bei Erwachsenen mit Sarkoidose die erhöhte Zahl im peripheren Blut gemessener TCR γ/δ -positiver Zellen mit einer verminderten Immunantwort und einer geringeren CD4⁺-Zellzahl korreliert [100]. Auch die ethnische Zugehörigkeit hat einen starken Einfluss auf den TCR γ/δ -Anteil der CD3⁺-Zellen. So konnte bei türkischen und asiatischen gesunden Probanden im Vergleich zu skandinavischen Probanden ein deutlich höherer Anteil an TCR γ/δ -Expression gefunden werden [29]. In der untersuchten Patientengruppe dieser Studie war die Patientin 7 türkischer Abstammung, ein deutlich erhöhter TCR γ/δ -Anteil fiel hier nicht auf. Die hohen Werte bei Patient 8 und 11 konnten mit keiner anderen Rezeptordiversität als der in Kapitel 3.2 genannten CD3-Expression bzw. CD4- und CD8-Expression korreliert werden. Das erhöhte (im Vergleich zur Verteilung beim gesunden Erwachsenen) Auftreten der TCR γ/δ bestätigt also die deutlich veränderte Immunlage bei Kindern mit ALL in der Erhaltungstherapie.

Der Anteil an CD16/56⁺CD3⁻-NK-Zellen ist im Mittel mit 9,9 % aller Lymphozyten deutlich, jedoch nicht signifikant höher als bei gesunden gleichaltrigen Kindern [81]. Die große Streuung der Ergebnisse zwischen 0 und 25% aller Lymphozyten deutet jedoch

auf eine unterschiedliche Entwicklung bzw. Aktivierung bei den untersuchten Patienten hin. Auch die signifikant positive Korrelation mit der TCR γ/δ bestätigt die Modifikation des sich während der Erkrankung und der Chemotherapie verändernden Immunsystems.

Die Erhöhung des T_4/T_8 -Quotienten auf im Mittel 2,56 zeigt eine Verschiebung hin zu den T_4 -Zellen, was einer signifikanten Abweichung von der Norm entspricht. Diese wird mit 1,3 (1,0-1,6) bzw. 1,5(0,9-1,5) angegeben [28, 44]. Andere Autoren beschreiben aber gerade bei jüngeren Patienten bis 3 Jahren auch CD4/CD8-Ratios von 2,4 (+0,6) [81]. Die Patienten 3, 7 und 10 waren in dieser Altersstufe, wobei die Patienten 3 und 10 die normalen CD4/CD8-Ratio von 1,8 bzw. 1,0 aufwiesen.

Die Interpretation der untersuchten Oberflächenantigene ist aufgrund von meist fehlenden altersentsprechenden Normwerten nur eingeschränkt möglich, daher wurde eine zusammenfassende Tabelle der bereits in Kapitel 3.1 erwähnten Normwerte erstellt (vgl. Tabelle 3.7)

Die umgekehrte Relation zwischen der Expression von CD28 und Leu15, wie sie bei Becton Dickinson beschrieben wird [24], konnte hier nicht gezeigt werden. Leu15 befindet sich mit 15% auf niedrigem Niveau. Die Expression ist auf den CD8⁺-Zellen im Mittel weniger als halb so hoch wie bei peripheren Lymphozyten gesunder Kinder [34]. Weiterhin fällt die geringe bis überhaupt nicht vorhandene Expression des 55kD-Anteils des Interleukin-2-Rezeptors CD25 sowohl auf den T_4 , als auch auf den T_8 -Zellen auf. Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen von Ohashi et al. [83], hier wird zumindest bei den CD4⁺-Zellen eine Expression bis 8% (1,2-15%) beschrieben. Die gleichbleibend niedrige CD25-Expression wird auch nur zum Teil durch die Expression des 75kD IL-2 Rezeptors CD122 auf sowohl den CD4⁺-, als auch auf den CD8⁺-Zellen ausgeglichen. Hier finden sich große interindividuelle Unterschiede, die Anteile schwanken zwischen 4% und 75% bei den CD4⁺- und zwischen 7% und 80% bei den CD8⁺-Zellen. Im Mittel ist die Expression des CD122 sowohl bei CD4⁺-, als auch bei CD8⁺-Zellen jedoch mehr als doppelt so hoch wie die Normwerte bei unstimulierten Zellen, der mit 10-15% aller normalen ruhenden peripheren Lymphozyten [24] bzw. der CD8⁺-Zellen [83] angegeben wird. Dies spricht für eine spezielle Hochregulierung dieses Rezeptormoleküls, die getrennt von der Regulierung des CD25 stattfinden kann und wohl eine spezielle Aktivierung der Subgruppen T_4 und T_8 markiert [121]. Dadurch würde sich auch die fehlende Korrelation zwischen CD25 und CD122 erklären.

Diese Ergebnisse wurden bei Erwachsenen gefunden, in den Übersichtsstudien von Osugi et al, Foerster et al, Neubert et al, Erkeller-Yuksel et al und Hulstaert et al finden sich keine Angaben über die CD25 / CD122 -Verteilung bei gesunden Kindern der entsprechenden Altersgruppe.

Die Verteilung der CD45RA-Expression mit nur 48% CD45RA⁺-CD4⁺-Zellen zeigt eine deutlich Verschiebung zu geringeren Werten als die der Norm. Diese werden mit 62-64% (51-69%) 45RA⁺- bei den CD4⁺-Zellen angegeben [44], so dass man von einer geringeren Zahl von CD4⁺-naiven T-Zellen ausgehen kann. Unterstützt werden diese Zahlen von Neubert et al, hier werden die Normwerte der entsprechenden Altersgruppe mit ca. 57% (+/-8,7%) angegeben. Im Gegensatz hierzu sind die Werte der CD45R0⁺-CD4⁺-Zellen höher, sie liegen bei Kindern in diesem Alter üblicherweise bei 31% (+/-8,6) [81]. Die gefundenen Werte der untersuchten Kinder liegen deutlich höher, im Mittel bei 59% (+/-16%). Die T-Helferzellen zeigen also eine deutliche Verschiebung hin zu einem höheren Anteil an kompetenten CD4⁺-Zellen. Ob dies auf die Krankheit oder auf die Chemotherapie zurückzuführen ist, lässt sich nicht mit Bestimmtheit sagen, hierzu wären weitere, longitudinale Studien erforderlich. Bei den CD8⁺-Zellen liegen die Werte für CD45RA⁺-Zellen im Normbereich, der Mittelwert der untersuchten Kinder lag bei 72% (+/-18%) CD45RA⁺-CD8⁺-Zellen, der Normwert bei ca. 68-73% (+/-6-8%) je nach Alterstufe [81]. Bei den CD45R0⁺-CD8⁺-Zellen jedoch fanden sich Unterschiede, sie liegen bei 36%(18%) und damit über den Normwerten von 25,3%(+/-8) [81]. Dies lässt auf eine erhöhte Bildung der cytotoxischen Memory-Zellen schließen [35, 40, 117], z.B. auf Grund der vorangegangenen Chemotherapie.

Bei der Verteilung des C1.7-Antigens, das normalerweise auf NK-Zellen und CD8⁺-Zellen zu 100% bzw. 50% exprimiert wird und das mit der Aktivität und der Effektivität der CD8⁺-Zellen in Zusammenhang gebracht wird [88, 108], zeigt sich eine deutliche Verminderung der Expression auf 19% (18%). Dies kann als ein Indiz für eine verminderte Effektivität der CD8⁺-cytotoxischen T-Zellen gelten.

Bei der Expression von weiteren Aktivierungsantigenen, wie CD69 und CD71 zeigt sich sowohl auf den CD4⁺ als auch auf den CD8⁺-Zellen eine deutliche Reduktion der Expression dieser Proliferationsmarker. Diese sind im Vergleich zu den publizierten Normwerten [28, 81] im Mittel auf min 1 Standardabweichung erniedrigt exprimiert. Die HLA-DR Expression ist auf den CD4⁺-Zellen bei einigen Patienten (Nr. 1,2,8,10,11)

signifikant erhöht, dies geht mit einer im Mittel erniedrigten HLA-DR Expression auf den CD8⁺-Zellen einher (insbesondere bei den Patienten 1,2,3,4,7,8).

Bei der Expression der verschiedenen „Docking-Moleküle“ wie Leu8 und CD28, das ja als eines der wichtigsten Co-stimulatorischen Moleküle gilt [51], lassen sich die Ergebnisse wie folgt interpretieren:

Die Expression von Leu8 auf CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen, ist mit 37% bzw. 48% deutlich geringer als von Kansas beschrieben [57]. Ein erhöhter Anteil an CD8⁺ Leu8⁻ kann zu einer verminderten humoralen Immunantwort führen, wie bei Myelom-Patienten nachgewiesen werden konnte [111]. Bei dem costimulatorischen Molekül CD28 finden sich bei den CD4-positiven Zellen sehr hohe Werte. Beinahe 97% aller T_H-Zellen tragen das Molekül, dies entspricht einer normalen Verteilung. Auch bei den CD8-positiven Zellen finden sich mit einer 50%-Verteilung Normalwerte, hier zeigt die hohe Streuung der Werte erhebliche interindividuelle Unterschiede bei den Patienten. Jedoch ließen sich wohl auf Grund der niedrigen Fallzahl keine signifikanten Untergruppen mit besonderem Apoptose- bzw. Proliferationsverhalten in der MLC identifizieren. Die herausragende Bedeutung von CD80/86 in der allogenen Immunantwort auf Leukämiezellen konnte für AML-Zellen exemplarisch nachgewiesen werden [18]. Da vor allem von den CD8⁺CD28⁺-Zellen eine alloantigen-spezifische Zytotoxizität vermittelt wird [53], könnte dies bei einigen Patienten auf eine verminderte Fähigkeit zur Erkennung von MHC-Klasse II vermittelter Fremdantigenität hindeuten. Umgekehrt ist bei diesen Patienten eine Suppression der Zell-Proliferation, die durch CD8⁺-CD28⁻-Zellen vermittelt wird [68] für eine evtl. Immunsuppression verantwortlich. Hier scheinen die ALL-Zellen (durch CD19 charakterisiert), die eine geringe Dichte von CD80 aufweisen, einen Einfluss auf die CD4⁺CD28⁺-Zellen zu haben, wie die signifikante Korrelation vermuten lässt (vgl. Tabelle 3.19, [18]). Diese Ergebnisse deuten für den Bereich der T-Zellen auf eine zwar deutliche Veränderung in der Zusammensetzung, aber nicht auf eine akute Beeinflussung hin. Inwieweit sich die Expression dieser Oberflächenmarker jedoch im Laufe der Therapie ändert bzw. ob die T-Zellen bereits bei Diagnosestellung eine Änderung im Profil der costimulatorischen Molekülexpression zeigen, lässt sich nur in weiteren Untersuchungen klären. Das deutliche Überwiegen vor allem der zytotoxischen Memoryzellen (mit relativ großen Schwankungen) innerhalb der Patientengruppe macht eine weitere Untersuchung dieser Parameter im Rahmen einer Beurteilung der Ansprechbarkeit bzw. Behandelbarkeit dieser Patienten interessant.

Bei den Ergebnissen zu den normalen peripheren B-Zellen (als CD20⁺ charakterisiert) ist grundsätzlich zu bemerken, dass der absolute Anteil an B-Zellen bei den gemessenen PNMC der Patienten sehr gering ist. Nur ca. 3% der gesamten Lymphozyten sind B-Zellen, im Gegensatz dazu findet sich bei gesunden Vergleichsgruppen ein Anteil an B-Lymphozyten von ca. 10-20% der Gesamtlymphozyten [41], als eine mögliche Erklärung hierfür sei die Chemotherapie genannt.

Die Expression von CD40 auf normalen B-Zellen wurde von mehreren Autoren beschrieben (u.a. [23, 102]). Auch in der untersuchten Patientengruppe fanden sich mit im Mittel 66% (27%) eher zu niedrige Werte für die CD40-Expression. Auffallend ist aber wiederum die große Variabilität. Bei einigen Patienten (5, 13) lagen die Werte deutlich unter 50%, einmal sogar war ein Nachweis überhaupt nicht zu erbringen (Pat. 11). CD40L wird auf normalen B-Zellen nicht exprimiert, jedoch konnte in einer Arbeit von Schattner [97] sowohl die Expression, als auch deren Funktionalität auf CLL - Zellen nachgewiesen werden. Diese haben einen hemmenden Einfluss auf die normale CD40/CD40L-vermittelte T/B-Zell Interaktion. Sie stören den direkten Zell-Zell-Kontakt bei der Aktivierung von B-Zellen durch die T-Zelle [61]. Bei den CD19⁺-ALL-Zellen zeigen sich im Mittel ähnlich hohe Werte bei der Expression von CD40 von 71% (+/-35), jedoch signifikant ($p < 0,01$) unterschiedliche Werte bei der CD40L-Expression verglichen mit der CD20⁺ Population, nämlich nur 2%(+/-4). Dies könnte bedeuten, dass die ALL-Zellen möglicherweise mit den B-Zellen um CD40L-Corezeptoren auf den T-Zellen konkurrieren. Nicht unbedingt plausibel zu erklären ist die in der Patientengruppe doch deutliche Expression von CD40L auf den B-Zellen von ca. 24%(+/-17). Dies könnte durch eine zusätzliche Aktivierung durch noch vorhandene ALL-Zellen hervorgerufen werden, die CD40 fast durchgehend auf einem Niveau von 71%(+/-35) exprimieren. Statistisch zeigt sich allerdings kein signifikanter Zusammenhang.

Die costimulatorische Wirkung von CD80 und CD86 (B7-1 und B7-2) wurde bereits in vielen Arbeiten gezeigt [20, 51, 82]. Die Expression von CD80 auf den CD20⁺-B-Zellen von 15% (13%) entspricht einem nicht aktivierten Status der B-Zellen. Die deutlichen Unterschiede zeigten jedoch keine Korrelation mit der Expression des Liganden CD28 auf T₄ bzw. T₈-Zellen bzw. mit Proliferations- bzw. Apoptoseindices. Es scheint also, als sei diese Verteilung zufällig. Bei der CD86-Expression auf normalen B-Zellen, einem zweiten Liganden des CD28, findet sich jedoch deutlich unabhängig von der CD80-Expression eine im Mittel signifikant ($p < 0,01$) höhere Expression von 48%(30%).

Die extremen Schwankungen von 2-93% lassen eine gesonderte Aktivierung bestimmter B-Zell-Populationen möglich erscheinen. Dies wird auch in der Arbeit von Nakajima [79] bestätigt. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass nicht nur in der primären Aktivierungsphase, sondern auch für die weitere Interaktion zwischen T_{H-2} - und B-Zelle das CD86-Molekül eine entscheidende Rolle spielt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass bei bestimmten Erkrankungen des Immunsystems (wie z.B. eine HIV-Infektion) auch Costimulatoren wie CD28 Auslöser für Apoptose sein können [65].

Bei den ALL-Zellen der Patienten zeigt sich ein direkter Zusammenhang zwischen den T-Zellen bzw. der Expression von CD28 und CD80 auf den ALL-Zellen. Die negative Korrelation der CD28-Expression auf den T-Zellen und der CD80-Expression auf den B-Zellen (vgl. Tabelle 3.19) gibt einen Hinweis darauf, dass offenbar die ALL-Zellen die Expression von CD80 in dem Maße zurückregulieren, in welchem die T_4 -Zellen die Dichte der CD28 erhöhen. Bei den T_8 -Zellen korreliert die CD28 Expression mit der CD86 Expression der autologen ALL-Zellen, dies könnte ein Hinweis sein, für eine mögliche direkte Interaktion dieser Rezeptoren.

Der FAS-Rezeptor CD95, einer der Schlüsselrezeptoren für die zellvermittelte Apoptose, ist bei den ALL-Zellen signifikant ($p < 0,001$) geringer exprimiert als auf den $CD20^+$ B-Zellen. Im Mittel beträgt die Dichte auf den normalen B-Zellen 35%(18%), bei den ALL-Zellen jedoch nur 1%(1,4%). Diese Daten bezüglich der ALL-Zellen werden bestätigt durch einige Untersuchungen [78, 113], die auch nur bei einem geringen Prozentsatz der ALL-Zellen einen positiven Fas-Antigen Status fanden. Normalerweise findet sich aber auf den $CD20^+$ -B-Zellen keine FAS-Rezeptor-Expression.

4.2. Interpretation der Proliferationsuntersuchungen in der MLC in Zusammenhang mit den FACS-Untersuchungen

Grundlegende Untersuchungen zur MLC bzw. MLR wurden bereits in den sechziger Jahren an Rattenlymphozyten [118] durchgeführt. Zu Beginn der siebziger Jahre folgten dann mehrere Untersuchungen zur allogenen Stimulation, die grundlegende Ergebnisse bzgl. der Kinetik und der Wachstumsbedingungen menschlicher Lymphozyten erbrachten [10]. Weitere Untersuchungen zur MLC-Aktivierung wurden 1979 von Rella und später auch von anderen Autoren [4, 94] durchgeführt. Schon damals konnte gezeigt werden, dass leukämische Blasten in der Lage sind, eine Aktivierung in der

MLC herbeizuführen. Auch eine Sensibilisierung für Leukämie-spezifische Antigene wurde bereits in der Literatur als mögliche Erklärung für die heterogenen Proliferationsergebnisse erwähnt [5], aber nicht genauer untersucht.

Diese Ergebnisse werden von den Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Studie gestützt und bestätigt. Auch hier finden sich sehr heterogene Befunde. Dem Zusammenhang zwischen der Anzahl der T₄-Zellen und den Proliferationsindizes scheint eine hemmende Wirkung der fehlenden Costimulation durch CD80 auf den ALL-Zellen zu Grunde zu liegen. Der signifikant negative Zusammenhang zwischen der Expression von CD86 auf den ALL-Zellen und dem Proliferationsindex lässt sich nicht eindeutig nachvollziehen, denn in der Literatur wird eine positive costimulatorische Wirkung dieses Moleküls beschrieben. Auch scheinen die T₈-Zellen einen direkten Einfluss auf die Proliferation zu haben:

Ist deren Anteil erniedrigt, so ist eine Erhöhung der Proliferationsindizes nachweisbar. Die Erniedrigung der CD8-Zellzahl wird physiologisch als Anergie nach Aktivierung mit einem Costimulator (z.B. B7-1) [22] beobachtet.

4.3. Interpretation der CDD-ELISA-Ergebnisse post-MLC auch in Bezug auf die phänotypischen FACS-Untersuchungen

Die Rolle der Apoptose in der normalen Entwicklung des Immunsystems und bei der Entstehung und Behandlung der akuten Leukämien wurde bereits in zahlreichen Studien ausführlich untersucht [71, 98]. Es wurde sowohl die Rolle verschiedener Oberflächenantigene wie CD40/CD40L [58], CD28/CD80/CD86 [3, 21, 112], CD95 [96] und auch die des T-Zell Rezeptors [48] beleuchtet, ebenso wie die Expression zahlreicher Gene wie BLX, BLC [115]. Die normale Entwicklung von T- und B-Lymphozyten führt über einen positiven und negativen Selektionszyklus, der vor allem im Thymus und der Rinde der Lymphknoten stattfindet und dort mehr als 90% der gebildeten Lymphozyten durch Apoptose-Induktion abtötet [51, 103]. Vor allem potentiell autoaggressive Lymphozyten werden so während der Reifung selektiv und hocheffektiv ausgefiltert [71]. Inwieweit apoptotische Vorgänge auch bei der ALL und vor allem in deren Dauertherapie in vivo eine Rolle spielen könnten, war ein Ziel der Untersuchungen in vitro. Denkbar wäre die Beeinflussung des Immunsystems im Sinne eines „Lernens“, nachdem spezielle T-Zellen in der Lage wären, die Ausbreitung der ALL-Zell-Klone zu stoppen und zu verhindern. Arbeiten zur „Minimal residual disease“ (MRD) belegen,

dass auch durch eine aggressive Chemotherapie nur ein Teil der ALL-Zellen bekämpft werden kann, meist in der Größenordnung von ca. vier bis fünf Zehnerpotenzen [30, 33]. Da jedoch bei einem großen Teil der Patienten ein Rezidiv auf Dauer verhinderbar ist, muss entweder das Wachstum bzw. die Bildung neuer ALL-Zellen aufgehört haben oder das Immunsystem in der Lage sein, die Neubildung erfolgreich zu bekämpfen. Erste Nachweise von bestimmten cytotoxischen T-Zell-Klonen gegen leukämische Blasten gelangen bereits 1995 [74]. Mit dem CDDE im Anschluss an die MLC sollte nun gezeigt werden, ob eine signifikante Steigerung der Apoptose in vitro einen solchen Effekt in vivo wahrscheinlich sein lässt. Es fanden sich die höchsten Apoptose-Werte bei Cokultur von Patientenzellen mit den jeweils eigenen ALL-Zellen, jedoch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse lassen verschiedene Erklärungsmöglichkeiten zu:

Im Rahmen des experimentellen Ansatzes wurde auf zusätzliche Costimulatoren, wie Interleukin-2 [106], Interleukin-3 [119] und weitere Interleukine [69], SSA [95], PHA [14], G-CSF [116] etc. verzichtet, um keine zusätzlichen Einflussfaktoren, die eine Apoptose verhindern, hinzuzufügen. In mehreren Untersuchungen zu dezidierten Wachstumsbedingungen in der MLC [13] werden auch unterschiedliche Bedingungen wie Länge der Inkubation [62], Temperatur, CO₂-Gehalt des Brutschrankes etc. (eigenen Untersuchungen, vgl. Tabelle 2.10) auf die Proliferationsergebnisse in der MLC genannt. Da jedoch Untersuchungen zum Nachweis von Apoptose in einer MLC noch nicht durchgeführt wurden, bleibt die Interpretation der Ergebnisse spekulativ. Normale B-Zellen werden in vitro bereits nach wenigen Stunden apoptotisch, B-ALL-Zellen zeigen nach ca. 72 Stunden im überwiegenden Teil bereits Anzeichen von Apoptose [54, 110]. Auch werden in der MLC nicht stimulierte MNC nach ca. 30 Stunden apoptotisch [17, 73]. So kann eine hohe absolute Apoptoserate zu einem geringen Apoptoseindex führen, wobei sich primär nicht unterscheiden lässt, ob die T-Zellen apoptotisch wurden, weil sie nicht stimuliert wurden, oder weil sie durch einen Reiz der ALL-Zellen anerg bzw. apoptotisch wurden. Zur Lösung dieser Frage wurde im Anschluss an die MLC versucht, mit Hilfe einer FACS-Untersuchung nachzuweisen, welche Zellen apoptotisch wurden. Hierbei wurden bestimmte Kontroll-Kombinationen aus Patienten-MNC (bestrahlt/nichtbestrahlt) und ALL-Zellen (bestrahlt/nichtbestrahlt) untersucht. Der Nachweis eines hohen Anteils an apoptotischen CD3⁺-Zellen bei der Eigenstimulation (nur MNC, keine ALL-Zellen) korreliert signifikant ($p < 0,05$) mit einem hohen Anteil an

Apoptose auch bei der Fremdstimulation. Dies deutet darauf hin, dass die Apoptose bei den MNC auftritt, bei den ALL-Zellen aber nicht.

Umgekehrt findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Eigenstimulation (nur ALL-Zellen) und der Fremdstimulation (ALL mit bestrahlten MNC). Hier zeigt sich bei beiden ein hoher Anteil von im Mittel 70-77% von apoptotischen Zellen. Im statistischen Vergleich aller Versuche lässt sich zusammenfassend sagen, dass immer bei einer Bestrahlung der ALL-Zellen die Apoptoserate signifikant ($p < 0,02$) niedriger war im Vergleich zur Bestrahlung der MNC der Patienten. Als mögliche Ursachen für diese Ergebnisse gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten:

Entweder stellen die bestrahlten ALL-Zellen für die MNC einen geeigneten Stimulus dar, dass diese nicht (bzw. in geringerer Zahl) apoptotisch werden, oder die ALL-Zellen, die von den bestrahlten T-Zellen nicht mehr stimuliert werden, werden in einem sehr hohen Maße apoptotisch. Zu diesen Erklärungsmöglichkeiten finden sich in der Literatur verschiedene Belege. So wurde zum einen nachgewiesen, dass γ -Strahlen an sich einen Apoptose-auslösenden Effekt haben [107], und zwar sowohl auf T-Zellen wie auf B-Zellen [91], als auch auf leukämische Zellen. Dass B-Zellen in Kokultur mit einem geeigneten Stimulus nicht apoptotisch werden, konnten bereits eine Vielzahl von Studien nachweisen [109]. Ebenso wurde bei ALL-Zellen eine Apoptoseinduktion durch Stimulation des CD86 erfolgreich verhindert [9, 42, 67]. Den Einfluss der Bestrahlung auf die Expression der Oberflächenmoleküle wurde ebenfalls bereits von verschiedenen Autoren erläutert [59, 77, 114, 120]. Diese Untersuchungen belegten, dass dies nur in speziellen, nicht vergleichbaren Untersuchungsbedingungen der Fall war. Die Ergebnisse sind hier widersprüchlich, so dass noch weitere Untersuchungen nötig sind, die in einer Triple-Färbungen sowohl die Kinetik, als auch die exaktere Differenzierung der apoptotischen Zellen messen.

4.4. Interpretation und Einordnung der rT-PCR-Ergebnisse

Der Nachweis von intrazellulärer mRNA ist der erste Nachweis einer Reaktion der Zelle auf äußere Einflüsse bzw. genetisch determinierte Abläufe. Um das Verhalten vor und nach MLC der unbestrahlten MNC noch genauer beurteilen zu können, wurden für die ersten fünf Patienten exemplarisch rT-PCR's auf verschiedene Rezeptorbestandteile bzw. apoptosevermittelnde Proteine durchgeführt. Im einzelnen war dies der T-Zell-Rezeptor CD3 und der B-Zell Rezeptor CD19. Um die Funktionalität der

Zellen im immunologischen Sinne zu zeigen, wurde auf folgende Aktivierungsproteine getestet: Granzyme A und B (Proteine, die eine entscheidende Rolle in der zellvermittelnden Cytotoxizität spielen [55, 79, 101]). Ebenfalls wurde versucht, mRNA von Perforin nachzuweisen, ein Protein, das ebenfalls von cytotoxischen T-Zellen bei der Lyse als fremd erkannter Zellen produziert wird [90]. Ein weiteres Strukturmolekül aus der Klasse Cytotoxizität ist TIA (Übersicht von [2]). Eine zentrale Rolle der Vermittlung von Apoptose spielt die Interaktion zwischen FAS-Rezeptor (CD95) und Fas-Ligand [37, 85]. Daher wurde versucht, mRNA für die Bildung von Fas-Ligand nachzuweisen. Fas, ein Mitglied der TNF-Familie [89], ist ein weiteres apoptoseauslösendes Protein, das vor allem in NK-Zellen zur Apoptoseinduktion gebildet wird [52]. Schließlich sind TNF α und Interleukin-2 als allgemeine Aktivitäts- und Proliferationssignale der zellvermittelnden Immunaktivität gut charakterisiert [45, 49, 99]. Die Ergebnisse der PCR's weisen eine Bildung von fast allen cytotoxizitäts- bzw. Apoptoseprotein m-RNA's, jedoch ohne Nachweis von IL-2 und TNF α in allen untersuchten Proben nach. Ein Unterschied in der Expression vor und nach MLC war nicht vorhanden, daher lässt das Ergebnis keine Rückschlüsse auf eine Aktivierung/Spezialisierung in der MLC zu. Ebenfalls muss angemerkt werden, dass methodenbedingt immer nur ein Gemisch aus peripheren MNC- und ALL-Zellen untersucht werden kann und trotz Bestrahlung der ALL-Zellen die RNA-Produktion nicht völlig ausgeschaltet wird.

Unklar bleibt, ob die nachgewiesenen Transskriptionsprodukte von ALL-Zellen oder von den MNC gebildet wurden. Prinzipiell ist jedoch der Nachweis von allen cytotoxischen-/apoptoseinduzierenden mRNA's in zumindest einem Teil der Proben auch bereits vor MLC ein Hinweis auf die aktivierte Immunlage bei den untersuchten Patienten unter Dauertherapie.

5. Zusammenfassung

1. Leukämische Blasten sind schlechte Aktivatoren in der MLC.
2. Es gibt deutliche Hinweise, dass der Interleukin-2 Rezeptor p75 unabhängig von der p55-Einheit während der Dauertherapie hochreguliert wird. Das zeigt, dass das Verhältnis der beiden Untereinheiten im Rahmen der Therapie beeinflusst wird (dies natürlich unter der Voraussetzung, dass die Patienten vor ihrer Erkrankung mit gesunden Kindern zu vergleichen sind).
3. Die Anzahl der $CD4^+CD45R0^+$ wie auch der $CD8^+CD45R0^+$ -Memory-T-Zellen ist bei den Patienten deutlich höher als in der Normalbevölkerung, d.h. es gibt mehr nicht-naive, also geprägte Lymphozyten bei diesen Patienten.
4. Es gibt Hinweise auf eine Erniedrigung der CD28-Expression auf $CD8^+$ -Zellen während der Erkrankung, dieses ist gerade in Bezug auf die zentrale Rolle in der Anergie/Aktivierung von T-Zellen dieses Costimulatorischen Moleküls relevant.
5. Die CD95 (FAS-) Expression auf den ALL-Zellen ist vor Beginn der Therapie nicht nachweisbar.
6. Die CD80- zusammen mit der CD40L-Expression auf ALL-Zellen spielt eine wichtige Rolle in der autologen Reaktion der T-Zellen.
7. Die Erhöhung des im peripheren Blut bestehenden Anteils an TCR γ/δ^+ -T-Zellen spiegelt eine veränderte Bildung und Modulation der T-Zell-Reifung bei den Patienten wieder und ist signifikant korreliert mit dem erhöhten Auftreten von NK-Zellen bei den ALL-Patienten.

Offensichtlich unterscheiden sich die Zellen des Immunsystems der Patienten deutlich von denen gesunder Kinder und es gibt kaum Oberflächenantigene, die nicht entweder durch die Erkrankung selber, oder aber durch die Therapie beeinflusst werden.

Für weitere Untersuchungen wäre vor allem die Kinetik der oben genannten Oberflächenmoleküle interessant, insbesondere hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung der einzelnen Oberflächenmoleküle durch die Chemotherapie. Im Speziellen stellt sich die Frage, ob CD40, CD40L, CD80, CD86 und CD95 auf den ALL-Blasten hochreguliert werden, so dass sie eine verstärkte Apoptosebereitschaft zeigen.

Zum Nachweis der Apoptose in vitro durch die MLC sind weitere Studien mit Tripelmarkerfärbungen verschiedener Kombinationen von Respondern/Stimulatoren denkbar, um eine genauere Analyse jener Zellen zu erhalten, die letztlich Apoptose auslösen bzw. die wirklich apoptotisch werden.

6. Anhang

6.1. Tabellen

Detailinformationen Antikörper				Isotyp-Kontrollen		
Ak	Isotyp	Firma	Bestellnum-mer	Isotyp	Firma	No
C1.7-PE	IgG1	IT	#1608	IgG1-FITC	BD	#349041
CD3-FITC / CD(16 + 56) – PE	IgG1	IT	#1326	IgG1-PE	BD	#349043
CD3-FITC	IgG1	DK	#F0818	IgG2a-FITC	BD	#349051
CD4-FITC	IgG1	DK	#F0766	IgG2a-PE	BD	#349053
CD4-PE	IgG1	DK	#R0805	IgG1-FITC	IT	#0670
CD8-TC	IgG2a	ME	#MHCD0806	IgG1-PE	IT	#0639
CD14-FITC	IgG2a	DK	#F0844	IgG2b-FITC	IT	#1267
CD20-TC	IgG-3	ME	#MHCD2006	IgM-FITC	IT	#1269
CD25-FITC	IgG1	BD	#347643	IgG1-FITC	PH	#33024X
CD30-FITC	IgG1	DK	#F0849	IgM-FITC	PH	#33064X
CD40-PE	IgG1	IT	#1936	IgG1-PE	PH	#33815X
CD40Ligand-PE	IgG1	PH	#33585X	IgG2b-PE	PH	#33045X
CD45RA-FITC	IgG1	IT	#0584	IgG2a-TC	ME:	#MG2a06
CD45R0-PE	IgG2a	DK	#R0843	IgG1-PE	ME	#MG104
CD57-FITC	IgM	IT	#0466	IgG1-FITC	DK	#X 0927
CD64-PE	IgG1	ME	#MHCD6404	IgG1-PE	DK	#X 0928
CD71-FITC	IgG2a	BD	#347513	IgG2a-FITC	DK	#X 0933
CD80-FITC	IgM	PH	#33514X	IgG2a-PE	DK	#X 0950
CD86-FITC (FUN-1)	IgG1	PH	#33404X			
CD86-PE (IT2.2)	IgG 2b	PH	#33435X			
CD95 – FITC	IgG1	IT	C5366			
HLA ABC –PE	IgG	DK	R7000			
HLA-DR-FITC	IgG2a	BD	#347363			
HLA-DR-PE	IgG1	ME	#MHLDR04			
Il-2-Rez p75 (CD122) – PE	IgG1	PH	#18745B			
Leu8-FITC	IgG2b	BD	#347443			
Leu15-PE	IgG2a	BD	#347557			
Leu-23-FITC (CD69)	IgG1	BD	#347823			
Leu 28-PE	IgG1	BD	#347823			
TCR- α/β -PE	IgG2b	IT	#1467			
TCR- γ/δ -FITC	IgG1	IT	#1571			

Legende:

DK: Fa Dako,

BD: Fa Becton Dickinson

MD: Fa Medac

IT: Fa Immunotech

PH: Fa Pharmingen

Tabelle 6.1 Detailinformationen der verwendeten Antikörper und Isotyp-Kontrollen

Separation von PNMC
Blut einfüllen (steril)
ca. 35 ml PBS hinzugeben
mit 12-13ml FICOLL unterschichten
Zentrifugation bei 400g
Leukozytenring in ein zweites Gefäß überführen
Auffüllen mit PBS
Zentrifugation mit 300g
Überstand abnehmen
mit 4°C PBS+ 2% FCS auffüllen
Zentrifugation mit 300g
Überstand abnehmen
mit ca. 700µl RPMI und 15%FCS auf 1ml auffüllen

Tabelle 6.2 Protokoll der Ficoll-Hypaque Separation

Patient	CD3 pos	davon TCR α/β ⁺	davon TCR γ/δ ⁺	T-4+ : T8+	NK-Zellen (16/56pos)	davon C 1.7+
1	69,6	34,7	6,0	1,5	20,6	27,6
2	19,3	36,2	9,2	2,4	50,4	42,0
3	76,2	29,3	1,1	1,8	17,3	6,8
4	90,1	30,5	3,1	1,7	5,9	1,7
5	66,7	0,7	8,0	1,2	2,6	42,1
6	96,8	1,0	2,6	2,7	2,0	0,1
7	64,6	2,3	6,9	7,6	24,7	14,6
8	46,3	0,7	42,3	2,1	36,9	46,2
9	75,5	1,4	19,1	n.b.	9,6	n.b.
10	14,8	2,0	5,7	1,0	15,6	100,0
11	88,9	13,3	76,8	0,3	9,9	4,5
12	78,8	66,7	4,0	1,6	19,6	8,9
13	79,1	100,0	5,3	3,1	13,8	1,3
MW	66,7	24,5	14,6	2,2	17,6	24,6
StdAbw	25,5	30,4	21,6	1,8	13,7	29,4

Tabelle 6.3 Verteilung von CD3-spezifischen Merkmalen im peripheren Blut von ALL-Patienten in Dauertherapie, MW: Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung , n.b. nicht bekannt

Patient	CD8+	davon Leu15+	davon CD25+	davon CD28+	davon CD45RA+	davon CD45R0+
1	32,6	28,2	0,9	47,2	76,1	35,6
2	3,3	23,1	0,8	27,8	74,6	33,5
3	27,4	4,7	0,4	57,9	86,2	29,4
4	33,6	6,2	0,1	22,0	85,0	23,6
5	35,0	14,4	0,8	32,4	73,9	36,6
6	16,6	1,2	0,3	76,4	57,0	54,9
7	6,6	23,4	0,3	54,5	95,0	11,1
8	9,5	37,6	0,0	56,3	64,9	45,3
9	23,4	5,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10	33,4	12,7	0,3	14,6	67,4	38,4
11	34,2	9,4	90,0	45,6	81,9	4,4
12	27,6	4,7	0,7	81,3	28,1	77,3
13	17,3	10,1	0,3	30,1	87,3	15,2
MW	23,1	13,9	7,9	45,5	73,1	33,8
StdAbw	11,8	11,0	25,9	20,9	17,8	19,9

Tabelle 6.4 Verteilung von CD8-spezifischen Merkmalen peripherer MNC bei ALL-Patienten in Dauertherapie (Teil 1), MW: Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung, n.b. nicht bekannt

Patient	CD8+	davon CD57+	davon CD62+	davon CD69+	davon CD71+	davon CD122+	davon HLA DR+
1	32,6	7,2	78,6	14,4	3,9	51,6	2,6
2	3,3	19,4	58,5	10,9	3,7	80,9	4,4
3	27,4	1,1	0,0	1,2	1,2	29,9	6,9
4	33,6	5,4	87,8	1,0	0,1	17,0	0,6
5	35,0	24,9	71,2	1,2	0,9	15,7	21,4
6	16,6	7,2	24,5	13,3	2,9	16,9	16,2
7	6,6	3,7	81,0	1,8	0,1	30,4	2,4
8	9,5	0,0	32,6	9,0	0,0	24,6	0,2
9	23,4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10	33,4	18,4	63,8	1,0	0,4	3,5	15,5
11	34,2	n.b.	77,8	88,5	97,3	6,8	26,1
12	27,6	9,0	29,7	3,0	1,9	12,9	16,3
13	17,3	13,3	19,6	5,7	1,2	7,7	0,6
MW	23,1	10,0	52,1	12,6	9,5	24,8	9,4
StdAbw	11,8	8,1	29,3	24,4	27,7	22,0	9,1

Tabelle 6.5 Verteilung von CD8 spezifischen Merkmalen peripherer MNC bei ALL-Patienten in Dauertherapie (Teil 2). MW: Mittelwert, SW: Standardabweichung, n.b. nicht bekannt

Patient	CD4+	davon CD28+	davon CD30+	davon CD45RA+	davon CD45R0+	davon CD122+
1	47,2	63,0	0,0	40,9	72,3	74,2
2	45,7	71,7	0,1	22,6	83,6	49,2
3	42,1	64,8	0,0	44,3	72,3	27,2
4	51,2	83,4	0,0	58,9	48,4	16,8
5	56,8	63,7	0,0	50,4	55,2	9,4
6	66,7	56,7	0,1	19,5	82,4	42,5
7	46,8	83,7	0,0	56,4	58,3	4,0
8	16,8	56,1	0,0	71,5	27,5	23,0
9	34,5	n.b.	0,0	n.b.	n.b.	n.b.
10	9,4	74,3	0,2	29,0	69,9	7,8
11	29,2	75,5	0,8	78,2	29,2	58,2
12	34,7	56,0	0,9	57,6	45,6	37,2
13	48,2	85,2	0,1	57,4	52,7	34,3
MW	40,7	69,5	0,2	48,9	58,1	32,0
StdAbw	15,7	11,0	0,3	18,4	18,7	21,6

Tabelle 6.6 Verteilung von CD4-spezifischen Merkmalen peripherer MNC bei ALL-Patienten in Dauertherapie (Teil 1). MW: Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung, n.b. nicht bekannt

Patient	CD4+	davon CD25+	davon CD62+	davon CD69+	davon CD71+	davon HLA DR+
1	47,2	0,8	69,5	5,4	1,2	8,0
2	45,74	2,0	9,0	2,4	8,1	30,4
3	42,12	0,7	0,1	1,1	0,1	0,9
4	51,17	0,3	51,2	0,1	0,0	1,6
5	56,8	0,7	64,1	0,1	0,4	3,2
6	66,71	2,4	12,2	1,0	0,3	8,8
7	46,79	2,5	54,3	0,1	0,0	1,3
8	16,85	0,4	24,3	0,2	0,0	10,2
9	34,48	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10	9,45	5,2	51,5	0,1	0,1	17,5
11	29,23	11,2	2,7	9,0	12,9	9,4
12	34,69	4,5	58,0	0,3	1,9	4,2
13	48,24	2,7	29,7	0,4	0,4	1,4
MW	40,73	2,8	35,6	1,7	2,1	8,1
StdAbw.	15,7	3,1	25,4	2,8	4,1	8,6

Tabelle 6.7 Verteilung von CD4-spezifischen Merkmalen peripherer MNC bei ALL- Patienten in Dauertherapie (Teil 2). MW: Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung, n.b. nicht bekannt

Patient	CD20 +	% davon CD40+	% davon CD40L+	% davon CD80+	% davon CD86+	%davon CD95+
1	8,5	85,3	42,0	15,0	42,6	47,0
2	9,4	96,8	16,2	3,6	88,9	18,1
3	3,0	82,5	10,6	45,9	64,5	15,5
4	2,7	75,6	7,2	13,0	29,8	27,2
5	2,4	30,9	35,1	6,4	2,2	0,0
6	1,9	61,5	0,7	11,2	19,7	55,9
7	4,0	85,6	23,8	2,0	5,6	38,6
8	6,4	97,3	2,5	5,1	93,8	41,5
9	0,5	50,0	9,0	8,5	16,5	13,2
10	2,9	68,9	50,3	34,6	71,4	55,5
11	0,1	0,7	35,3	3,3	58,7	65,3
12	0,9	80,9	53,5	23,2	87,8	41,9
13	0,2	42,2	32,7	28,1	50,0	32,5
MW	3,3	66,0	24,5	15,4	48,6	34,8
StdAbw.	3,0	28,3	18,2	13,7	32,1	19,3

Tabelle 6.8 Verteilung von B-Zell-(CD20+)-spezifischen Merkmalen peripherer MNC bei ALL-Patienten in Dauertherapie. MW: Mittelwert, StdAbw.: Standardabweichung

Patient	CD19 +	% davon CD40+	% davon CD40L+	% davon CD80+	% davon CD86+	%davon CD95+
1	27,5	27,1	0,0	0,2	29,5	0,4
2	38,0	99,9	2,3	0,0	73,1	0,2
3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
4	88,6	99,8	0,6	0,6	4,4	0,3
5	71,1	69,7	0,2	0,5	9,3	2,9
6	79,3	99,5	0,2	0,2	98,7	0,3
7	76,9	7,7	0,8	0,6	85,7	0,8
8	90,9	92,0	2,1	2,9	75,8	1,6
9	96,9	99,9	0,7	0,4	82,2	0,1
10	76,2	5,9	0,7	0,4	45,5	0,1
11	94,7	85,1	1,0	0,5	19,2	0,0
12	86,1	94,7	16,7	0,7	83,9	2,8
13	75,3	99,3	0,2	1,5	4,7	1,4
MW	75,1	73,4	2,1	0,7	51,0	0,9
StdAbw	21,5	37,5	4,6	0,8	35,9	1,0

Tabelle 6.9 Verteilung spezifischer Merkmale von bei Diagnosestellung gewonnenen ALL-Zellen(CD19⁺). MW: Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung, n.b. nicht bekannt

6.2. Verwendete Abkürzungen

7-AAD	7-amino actinomycin D
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
APO-II	CD95
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
bzgl.	bezüglich
ca.	Circa
cALL	Akute lymphoblastische Leukämie vom common-Typ (common acute lymphoblastic leukemia)
CD	Differenzierungsantigen auf der Zelloberfläche (Cluster of differentiation)
CDDE	Apoptose-messender ELISA, Cell-death-detection-ELISA
CMV	Zytomegalievirus (Cytomegalivirus)
CRP	C-reaktives Protein
ELISA	Testverfahren, das Antigene oder Antikörper mittels eines Enzym-markierten Antikörpers sichtbar macht, (Enzyme linked Immuno Sorbent Assay)
FACS	Gerät zur automatisierten Zellzählung und Differenzierung (Fluoreszin activated cell sorter(sorting))
FCS	fötales Kälberserum (Fetal calf serum)
FITC	Fluoreszin-iso-thiozyanat
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-bildender Faktor (Granylozyte- colony stimulating factor)
IL	Interleukin
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex (Major histocompatibility complex)
MLC	gemischte Lymphozytenkultur (mixed lymphocyte culture)
MLR	gemischte Lymphozytenreaktion (mixed lymphocyte reaction)
MNC	mononukleäre Zellen (mononuclear cells)
MRD	Geringe zurückbleibende Erkrankung, d.h. nicht abgestorbene, potentiell ein Rezidiv auslösende Zellen (minimal residual disease)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
MW	Mittelwert
n.b.	nicht bekannt
n.s.	nicht signifikant
NK	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate buffer saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phyco-Erythin
PMNC	Periphere mononukleäre Zellen (peripheral mononuclear cells)
RPMI	Zellmedium nach Moore [75]
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
StdAbw	Standardabweichung
TC	Tri color (PE-TR-Konjugat)
TIA	Intrazelluläres T-Zell-Antigen (T-cell intracellular antigen)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
u.a.	unter anderem
vgl.	Vergleiche

6.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Normalwerte ausgewählter Oberflächenantigene bei bestimmten Lymphozytensubpopulationen aus der Literatur (vgl. [19, 23, 34, 56, 66, 72, 81, 83, 88]). Soweit vorhanden wurden altersspezifische, an die Patientengruppe angepasste Normwerte verwendet (vgl. Tabelle 3.7).....	28
Abbildung 2:	T4-T8-Quotient bei ALL-Patienten unter Dauertherapie	29
Abbildung 3:	Mittlere Verteilung von Oberflächenantigenen auf CD8 ⁺ -Zellen unter Dauertherapie bei Patienten mit ALL. Zahlen: MW (StdAbw.)	29
Abbildung 4:	Mittlere Verteilung von ausgewählten Oberflächenantigenen auf CD4 ⁺ -Zellen bei Patienten mit ALL unter Dauertherapie, Zahlen MW (StdAbw.).....	31
Abbildung 5:	Verteilung von Oberflächenantigenen auf B-Zellen bei Patienten mit ALL, Zahlen MW (StdAbw.).....	31
Abbildung 6:	Patient 1, Charakterisierung PMNC. Die Summe der CD45RA- und CD45R0-Werte (bei den CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellem Setzen der Lymphozytengates über 100%.	33
Abbildung 7:	Patient 2, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA und CD45R0-Werte (bei den CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellem Setzen der Lymphozytengates über 100%.	34
Abbildung 8:	Patient 3, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA und CD45R0- Werte (bei den CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%	35
Abbildung 9 :	Patient 4, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA- und CD45R0-Werte (bei den CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%.	36
Abbildung 10:	Patient 5, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA- und CD45R0-Werte (bei den CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%	37
Abbildung 11:	Patient 6, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA- und CD45R0-Werte (bei den CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%	38
Abbildung 12:	Patient 7, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA- und CD45R0-Werte Werte (bei den CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%.....	40
Abbildung 13:	Patient 8, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA- und CD45R0-Werte Werte (bei den CD8 ⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%.	41
Abbildung 14:	Patient 9, Charakterisierung der PMNC. Bei diesem Patienten konnten wegen zu geringer Leukozytenzahlen nur ein geringerer Teil der Oberflächenmarker bestimmt werden.	42
Abbildung 15:	Patient 10, Charakterisierung der PMNC.	43

Abbildung 16: Patient 11, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA- und CD45R0-Werte (bei den CD4 ⁺ Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%. CD57 konnte auf Grund von mangelndem Material nicht bestimmt werden.	45
Abbildung 17: Patient 12, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA- und CD45R0-Werte (bei den CD4 ⁺ - und den CD8 ⁺ -Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%.....	46
Abbildung 18: Patient 13, Charakterisierung der PMNC. Die Summe der CD45RA und CD45R0-Werte (bei den CD4 ⁺ - und den CD8 ⁺ -Zellen) ist auf Grund von individuellen Setzen der Lymphozytengates über 100%.....	47
Abbildung 19: Verteilung von Oberflächenantigenen auf den ALL-Zellen der untersuchten Patienten, Zahlen MW (StdAbw).	50
Abbildung 20: Korrelation zwischen RA- und R0-Anteil des CD45 auf T ₄ und T ₈ -Zellen	59
Abbildung 21: Der Anteil der TCR γ/δ -positiven Zellen sinkt mit der relativen Anzahl von T ₄ und T ₈ -Lymphozyten.	60
Abbildung 22: Je mehr CD86 auf den ALL-Zellen der Patienten exprimiert wird, desto höher ist der Anteil der CD28-positiven T ₈ -Zellen.	60
Abbildung 23: Zusammenhang zwischen der Expression von CD45 RA bzw. R0, also der „Reifung“ von T-Zellen während der Dauertherapie und der Expression von CD80 auf den ALL-Zellen.	61
Abbildung 24: Zusammenhang von Apoptoseindices und T4/T8-Quotient, $r=0,94$, $p<0.01$: Je höher der T4/T8-Quotient desto stärker ist die Apoptose bei der Co-Inkubation von MNC des Patienten mit der eigenen ALL.	62

6.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 : Patientengruppe: Alter, Gewicht und Zeitpunkt der Blutabnahme, n.b. nicht bekannt.....	7
Tabelle 2.2: Kontrollgruppe: Alter, Körpergewicht und Leukozyten, n.b.: nicht bekannt.....	8
Tabelle 2.3 Spezifizierung der verwendeten T-Lymphozytenantikörper	11
Tabelle 2.4 Untersuchte Antikörperkombinationen an peripheren mononukleären Zellen der onkologischen Patienten unter Dauertherapie	12
Tabelle 2.5 Spezifizierung der verwendeten B-Lymphozytenantikörper	12
Tabelle 2.6 Charakterisierung der lymphatischen Zelllinie 207 nach [25]	13
Tabelle 2.7 Charakterisierung der lymphatischen Zelllinie 697 nach [26]	14
Tabelle 2.8 FACS-Klassifizierung der ALL-(Target)-Zellen	16
Tabelle 2.9 Übersicht über die in der RT-PCR verwendeten Primer mit Referenzen	20
Tabelle 2.10 Zusammenfassung der Proliferationsvorversuche	21
Tabelle 2.11 Übersicht über verschiedene Apoptoseexperimente	23
Tabelle 3.1 Übersicht über die Subpopulationen der untersuchten CD3 ⁺ -Zellen der Patienten	26
Tabelle 3.2 Übersicht über die Subpopulationen der untersuchten CD8 ⁺ -Zellen der Patienten, Teil 1 ...	26
Tabelle 3.3 Übersicht über die Subpopulationen der untersuchten CD8 ⁺ -Zellen der Patienten, Teil 2 ...	26
Tabelle 3.4 Übersicht über die Subpopulationen der untersuchten CD4 ⁺ -Zellen der Patienten, Teil 1 ...	26
Tabelle 3.5 Übersicht über die Subpopulationen der untersuchten CD4 ⁺ -Zellen der Patienten, Teil 2 ...	26
Tabelle 3.6 Übersicht über die Subpopulationen der untersuchten CD20 ⁺ -Zellen der Patienten	26
Tabelle 3.7 Zusammenfassung publizierter Normwerte für die Verteilung bestimmter Oberflächenantigene auf CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Lymphozyten sowie B-Lymphozyten. Soweit vorhanden, wurden altersspezifische Normwerte herangezogen und als Mittelwert (+/- Standardabweichung) präsentiert. In einigen Publikationen wurden nur Mittelwerte und Spannweiten der jeweiligen Ergebnisse angegeben, diese sind die Werte in {}. n.b.: nicht bekannt.	27
Tabelle 3.8 Regulation von verschiedenen Oberflächenmarkern auf den CD4 ⁺ -Zellen im peripheren Blut der Patienten unter Dauertherapie. Bei Abweichung bis einer StdAbw: ⇔, bei Abweichung bis zwei StdAbw.: ↓ bzw. ↓↓, bei mehr als zwei StdAbw: ↓↓↓ bzw. ↑↑↑. Bei Patient 9 lag nicht genügend Material für die Untersuchung der PMNC vor. Für CD30 existieren keine Normalverteilungen für die Expression auf T ₄ -Zellen, sodass diese nicht aufgeführt wurden. n.b.: nicht bekannt	48
Tabelle 3.9 Regulation von verschiedenen Oberflächenmarkern auf den CD8 ⁺ -Zellen der Patienten unter Dauertherapie. Bei Abweichung bis einer StdAbw: ⇔; bei Abweichung bis zwei StdAbw.: ↓ bzw. ↓↓; bei mehr als zwei StdAbw: ↓↓↓ bzw. ↑↑↑. Bei Patient 9 lag nicht genügend Material für die Untersuchung der PMNC vor. Für CD30, CD45RA und CD62L existieren keine Normalverteilungen für die Expression auf T ₈ -Zellen, sodass diese nicht aufgeführt wurden. n.b.: nicht bekannt	49
Tabelle 3.10 Regulation von verschiedenen Oberflächenmarkern auf peripheren CD20 ⁺ -B-Zellen der untersuchten Patienten unter Dauertherapie. Da hier keine Standardabweichungen vorliegen, wurde bei der Auszeichnung wie folgt vorgegangen: Werte innerhalb der angegeben Wertebereichen in der Originalpublikation: ⇔ ; abweichend nach oben : ↑; abweichend nach unten	

↓, für CD40L sind keine Normwerte für CD20 ⁺ veröffentlicht, daher wurde dieser Marker in der Tabelle nicht berücksichtigt.....	49
Tabelle 3.11 Apoptest /7-AAD- Untersuchungen post MLC. Nur bei einem Teil der Patienten war post-MLC genügend Material zur Durchführung der Untersuchungen vorhanden. MW: Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung. Linke Spalten: Kultur nur der MNC (R und S); rechte Spalten: Kultur MNC (R) + ALL (S)	51
Tabelle 3.12 7-AAD-Untersuchungen an CD19 ⁺ ALL-Zellen post MLC. Nur bei einem Teil der Patienten war post-MLC genügend Material zur Durchführung der Untersuchungen vorhanden (MW: Mittelwert, StdAbw.: Standardabweichung). Linke Spalte: nur ALL-Zellen als R und S eingesetzt, rechte Spalte ALL-Zellen als Responder (R) eingesetzt und MNC als Stimulatoren (S).....	52
Tabelle 3.13 Propidiumjodid-Untersuchung auf Membranbeständigkeit post MLC. Nur bei einem Teil der Patienten war post-MLC genügend Material zur Durchführung der Untersuchungen vorhanden (MW: Mittelwert, StdAbw.: Standardabweichung). Linke Spalten: Nachweis von CD3 ⁺ Zellen bei Cokultur von MNC des Patienten (R) mit eigenen, dem Patienten zugehörige ALL-Zellen als Stimulatoren (S). Rechte Spalten: Nachweis von CD3 ⁺ Zellen bei Cokultur von MNC (R) des Patienten mit fremden, nicht dem Patienten zugehörige ALL-Zellen als Stimulatoren (S).....	52
Tabelle 3.14 Proliferationsindices der Patienten (R1) in der MLC, BRDU-ELISA, MW Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung. R1: Responder (unbestrahlte Zellen) des Patienten, S. Stimulator (bestrahlte Zellen), S1: Patient, S2: gesunde Kontrolle, eigene ALL, S4: Zelllinie 207, S5 Zelllinie 697, S6: fremde ALL, n.b. nicht bekannt.....	53
Tabelle 3.15 Proliferationsindices der Kontrollen (R2) in der MLC, BRDU-ELISA, MW: Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung. R2: Responder (unbestrahlte Zellen) der gesunden Kontrolle, S. Stimulator (bestrahlte Zellen), S1: Patient, S2: gesunde Kontrolle, S3: ALL-Zellen des Patienten, S4: Zelllinie 207, S5 Zelllinie 697, S6: fremde ALL, n.b. nicht bekannt.....	54
Tabelle 3.16 Apoptoseindices der Patienten (R1) in der MLC, CDDE-ELISA, MW: Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung. R1: Responder (unbestrahlte Zellen) des Patienten, S. Stimulator (bestrahlte Zellen), S1: Patient, S2: gesunde Kontrolle, S3: eigene ALL, S4: Zelllinie 207, S5 Zelllinie 697, S6: fremde ALL, n.b. nicht bekannt	55
Tabelle 3.17 Apoptoseindices der Kontrollen (R2) in der MLC, CDDE-ELISA, MWW Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung. R2: Responder (unbestrahlte Zellen) der gesunden Kontrolle. S. Stimulator (bestrahlte Zellen), S1: Patient S2: gesunde Kontrolle, S3: ALL-Zellen des Patienten, S4: Zelllinie 207, Apoptoseindices der Kontrollen (R2) in der MLC, CDDE-ELISA, S5 Zelllinie 697, S6: fremde ALL, n.b. nicht bekannt	56
Tabelle 3.18 Ergebnisse der RT-PCR: Nachweis von verschiedenen m-RNA bestimmter Signal- bzw. zellspezifischer Proteine. β-Aktin: positiv-Kontrolle für den Nachweis von RNA und die erfolgreiche Umschreibung in cDNA, mit + ist der positive Nachweis markiert, mit - kein Signal.TiA: T-cell intracellular antigen, Gr A: Granzyme A, Gr B: Granzyme B, FasL: Fas-Ligand, Perf: Perforin, Apo: CD95/Fas, TNF β: Tumor Nekrose Faktor β.....	57
Tabelle 3.19 Zusammenfassende signifikante Korrelationen mit Testverfahren, Bereich der Verteilung von Oberflächenmarkern auf den MNC während der Dauertherapie	58

Tabelle 3.20 Zusammenfassung Korrelation: Zusammenhang zwischen MLC-Proliferation/Apoptose mit Oberflächenmarkern der MNC während der Dauertherapie	58
Tabelle 3.21 Korrelationen zwischen MNC während der Dauertherapie und autologen ALL-Zellen	58
Tabelle 6.1 Detaillinformationen der verwendeten Antikörper und Isotyp-Kontrollen	75
Tabelle 6.2 Protokoll der Ficoll-Hypaque Separation	76
Tabelle 6.3 Verteilung von CD3-spezifischen Merkmalen im peripheren Blut von ALL-Patienten in Dauertherapie, MW: Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung , n.b. nicht bekannt	76
Tabelle 6.4 Verteilung von CD8-spezifischen Merkmalen peripherer MNC bei ALL-Patienten in Dauertherapie (Teil 1), MW: Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung, n.b. nicht bekannt	77
Tabelle 6.5 Verteilung von CD8 spezifischen Merkmalen peripherer MNC bei ALL-Patienten in Dauertherapie (Teil 2). MW: Mittelwert, SW: Standardabweichung, n.b. nicht bekannt.....	77
Tabelle 6.6 Verteilung von CD4-spezifischen Merkmalen peripherer MNC bei ALL-Patienten in Dauertherapie (Teil 1). MW: Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung, n.b. nicht bekannt	78
Tabelle 6.7 Verteilung von CD4-spezifischen Merkmalen peripherer MNC bei ALL- Patienten in Dauertherapie (Teil 2). MW: Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung, n.b. nicht bekannt	78
Tabelle 6.8 Verteilung von B-Zell-(CD20+)-spezifischen Merkmalen peripherer MNC bei ALL-Patienten in Dauertherapie. MW: Mittelwert, StdAbw.: Standardabweichung	79
Tabelle 6.9 Verteilung spezifischer Merkmalen von bei Diagnosestellung gewonnenen ALL-Zellen(CD19 ⁺). MW: Mittelwert, StdAbw: Standardabweichung, n.b. nicht bekannt	79

6.5. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Felix Ralph Rockmann
Geburtsdatum	21. Januar 1972
Geburtsort	Aschaffenburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	evangelisch
Eltern	Helmut und Gertraud Rockmann, geb. Wiedemann

Schulbildung

1978-1980	Grundschule am Ravensburger Ring, München
1980-1982	Grundschule am Bacheifeld, Berchtesgaden
1982-1985	Math.-Naturwiss. Gymnasium, Berchtesgaden
1985-1991	Gabelsberger Gymnasium, Mainburg
15. Juli 1991	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1991-1992	Pflegedienst, Kreiskrankenhaus Rotthalmünster
-----------	-----------------------------------------------

Berufsausbildung

11/92-10/94	Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
11/94-04/98	Klinisches Studium an der Technischen Universität, München
05/98-04/99	Praktisches Jahr
05/99	Ärztliche Prüfung
08/99-01/01	Arzt im Praktikum, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I am Klinikum der Universität Regensburg, Direktor Prof. Dr. J. Schölmerich
seit 02/01	Assistenzarzt, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I am Klinikum der Universität Regensburg, Direktor Prof. Dr. J. Schölmerich

6.6. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Reinhardt für die großzügige Überlassung des Themas sowie Herrn Dr. med. Daniel Stachel für die unermüdliche Betreuung, seine andauernde Diskussionsbereitschaft, für die fachliche und menschliche Unterstützung sowie für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei:

- Frau Claudia Kaiser für ihre umfassende Unterstützung in der harten Anfangszeit.
- Frau Gabi Weimer für ihre zahlreichen Anregungen.
- Frau Rita Meilbeck, die mir eine große Hilfe bei allen praktischen Arbeiten war.
- Herrn Professor Dr. Wank und seinen Mitarbeiterinnen vom Immunologischen Institut für die wohlwollende methodische Unterstützung, ohne die ein großer Teil dieser Arbeit nicht zustande gekommen wäre.
- Herrn Professor Dr. Belohradsky für die freundliche Überlassung des FACScan-Gerätes sowie für so manchen methodischen und organisatorischen Hinweis. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht entstanden. Seine Mitarbeiterinnen Frau Anett Bader, Frau Irmgard Eckerlein, Frau Otti Bieberle und Frau Evi Meisel haben mich zudem immer mit Rat und Tat bei der Bedienung des FACScans unterstützt.
- Den Ärzten und Schwestern der onkologischen Ambulanz/Tagesklinik und der pädiatrischen Ambulanz für die immer freundliche Mitarbeit und geduldige Hilfe.
- Der Friedrich-Bauer-Stiftung und der Elterninitiative Intern 3, ohne deren finanzielle Unterstützung diese Arbeit nicht realisiert worden wäre.
- Frau Dr. Mirjam Elze, für die Geduld und Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank geht an alle Kinder der onkologischen und der pädiatrischen Ambulanz, die sich für diese Studie zur Verfügung gestellt haben und an deren Eltern; ihnen sei diese Doktorarbeit gewidmet.

Schließlich aber wäre diese Arbeit ohne die fortwährende Unterstützung und Geduld meiner Eltern und Geschwister nie möglich und fertig geworden. Auch dafür möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken!

6.7. Literaturverzeichnis:

1. Aldhous, M.C., G.M. Raab, K.V. Doherty, J.Y. Mok, A.G. Bird, and K.S. Froebel, *Age-related ranges of memory, activation, and cytotoxic markers on CD4 and CD8 cells in children*. J Clin Immunol, 1994. **14**(5): p. 289-98.
2. Anderson, P., *TIA-1: structural and functional studies on a new class of cytolytic effector molecule*. Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **198**: p. 131-43.
3. Aoki, N., M. Inobe, M. Murakami, R. Abe, and H. Iizuka, *The functional role of B7 molecules on the induction of thymocyte activation and apoptosis*. Microbiol Immunol, 1998. **42**(8): p. 555-65.
4. Ashman, L.K., *Stimulatory ability of human leukaemic cells in the allogeneic mixed leucocyte reaction*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1983. **61** (Pt 4): p. 477-88.
5. Ashman, L.K., D.E. O'Keefe, C.A. Juttner, I.R. Toogood, and M.S. Rice, *Autologous responses to human leukaemic cells in mixed leucocyte culture*. Cancer Immunol Immunother, 1986. **22**(2): p. 95-9.
6. Blewitt, R.W., A.C. Abbott, and C.C. Bird, *Mode of cell death induced in human lymphoid cells by high and low doses of glucocorticoid*. Br J Cancer, 1983. **47**(4): p. 477-86.
7. Blom, B., M.C. Verschuren, M.H. Heemskerk, A.Q. Bakker, E.J. van Gastel-Mol, I.L. Wolvers-Tettero, J.J. van Dongen, and H. Spits, *TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation*. Blood, 1999. **93**(9): p. 3033-43.
8. Boeck, G., *Current status of flow cytometry in cell and molecular biology*. Int Rev Cytol, 2001. **204**: p. 239-98.
9. Bolognesi, A., L. Polito, P.L. Tazzari, R.M. Lemoli, C. Lubelli, M. Fogli, L. Boon, M. de Boer, and F. Stirpe, *In vitro anti-tumour activity of anti-CD80 and anti-CD86 immunotoxins containing type 1 ribosome-inactivating proteins*. Br J Haematol, 2000. **110**(2): p. 351-61.
10. Bondevik, H. and E. Thorsby, *The human mixed lymphocyte culture (MLC) interaction after in vivo alloimmunization. I. Kinetics*. Cell Immunol, 1974. **11**(1-3): p. 409-18.
11. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood*. Scand. J. Clin. Lab. Invest, 1963. **21**, Suppl. 97.

12. Burtrum, D.B., S. Kim, E.C. Dudley, A.C. Hayday, and H.T. Petrie, *TCR gene recombination and alpha beta-gamma delta lineage divergence: productive TCR-beta rearrangement is neither exclusive nor preclusive of gamma delta cell development*. J Immunol, 1996. **157**(10): p. 4293-6.
13. Campana, D., E. Coustan-Smith, A. Manabe, M. Buschle, S.C. Raimondi, F.G. Behm, R. Ashmun, M. Arico, A. Biondi, and C.H. Pui, *Prolonged survival of B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells is accompanied by overexpression of bcl-2 protein*. Blood, 1993. **81**(4): p. 1025-31.
14. Catena, C. and A. Mattoni, *Damage to DNA by tritiated thymidine and its development in normal human (PHA-stimulated lymphocytes) and leukemic (Molt-3) lymphoblasts*. Boll Soc Ital Biol Sper, 1985. **61**(7): p. 1075-81.
15. Chipeta, J., Y. Komada, X.L. Zhang, T. Deguchi, K. Sugiyama, E. Azuma, and M. Sakurai, *CD4+ and CD8+ cell cytokine profiles in neonates, older children, and adults: increasing T helper type 1 and T cytotoxic type 1 cell populations with age*. Cell Immunol, 1998. **183**(2): p. 149-56.
16. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
17. Collins, R.J., L.A. Verschuer, B.V. Harmon, R.L. Prentice, J.H. Pope, and J.F. Kerr, *Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro*. Br J Haematol, 1989. **71**(3): p. 343-50.
18. Costello, R.T., F. Mallet, D. Sainty, D. Maraninchi, J.A. Gastaut, and D. Olive, *Regulation of CD80/B7-1 and CD86/B7-2 molecule expression in human primary acute myeloid leukemia and their role in allogenic immune recognition*. Eur J Immunol, 1998. **28**(1): p. 90-103.
19. Creemers, P.C., *Determination of co-expression of activation antigens on proliferating CD4+, CD4+ CD8+ and CD8+ lymphocyte subsets by dual parameter flow cytometry*. J Immunol Methods, 1987. **97**(2): p. 165-71.
20. Damle, N.K., P.S. Linsley, and J.A. Ledbetter, *Direct helper T cell-induced B cell differentiation involves interaction between T cell antigen CD28 and B cell activation antigen B7*. Eur J Immunol, 1991. **21**(5): p. 1277-82.
21. Daniel, P.T., A. Kroidl, S. Cayeux, C. Scholz, I. Sturm, T. Blankenstein, A. Pezzutto, and B. Dorken, *Retroviral B7.1 gene transfer in cancer cells protects*

- cytotoxic T cells from deletion by "veto" apoptosis. Adv Exp Med Biol, 1998. 451: p. 265-76.*
22. Deeths, M.J. and M.F. Mescher, *ICAM-1 and B7-1 provide similar but distinct costimulation for CD8+ T cells, while CD4+ T cells are poorly costimulated by ICAM-1. Eur J Immunol, 1999. 29(1): p. 45-53.*
 23. Deneys, V., A.M. Mazzon, J.L. Marques, H. Benoit, and M. De Bruyere, *Reference values for peripheral blood B-lymphocyte subpopulations: a basis for multiparametric immunophenotyping of abnormal lymphocytes. J Immunol Methods, 2001. 253(1-2): p. 23-36.*
 24. Dickinson, B., *Anti-Leu-28 [CD28]*, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131-1807, Ordering Information (800) 223-8226; Customer Support Center (800), 448-BDIS: Becton Dickinson, Source Book Section.
 25. Drexler, H.G., 207, in *The Leukemia-Lymphoma Cell Line FactsBook*. 2001, Academic Press: San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo. p. 80.
 26. Drexler, H.G., 697, in *The Leukemia-Lymphoma Cell Line FactsBook*. 2001, Academic Press: San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo. p. 82.
 27. Edgington, S.M., *Looking death in the eye: apoptosis and cancer research. Is cancer really caused by cells refusing to commit suicide on cue? Biotechnology (N Y), 1993. 11(7): p. 787-92.*
 28. Erkeller-Yuksel, F.M., V. Deneys, B. Yuksel, I. Hannet, F. Hulstaert, C. Hamilton, H. Mackinnon, L.T. Stokes, V. Munhyeshuli, F. Vanlangendonck, and et al., *Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. J Pediatr, 1992. 120(2 Pt 1): p. 216-22.*
 29. Esin, S., M. Shigematsu, S. Nagai, A. Eklund, H. Wigzell, and J. Grunewald, *Different percentages of peripheral blood gamma delta + T cells in healthy individuals from different areas of the world. Scand J Immunol, 1996. 43(5): p. 593-6.*
 30. Estrov, Z. and M.H. Freedman, *Detection of residual disease in acute lymphoblastic leukemia of childhood. Leuk Lymphoma, 1999. 33(1-2): p. 47-52.*

31. Findley, H.W., Jr., M.D. Cooper, T.H. Kim, C. Alvarado, and A.H. Ragab, *Two new acute lymphoblastic leukemia cell lines with early B-cell phenotypes*. Blood, 1982. **60**(6): p. 1305-9.
32. Foerster, M., I. Delgado, K. Abraham, S. Gerstmayr, and R. Neubert, *Comparative study on age-dependent development of surface receptors on peripheral blood lymphocytes in children and young nonhuman primates (marmosets)*. Life Sci, 1997. **60**(10): p. 773-85.
33. Foroni, L., C.J. Harrison, A.V. Hoffbrand, and M.N. Potter, *Investigation of minimal residual disease in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia by molecular analysis*. Br J Haematol, 1999. **105**(1): p. 7-24.
34. Gane, P., O. Fain, I. Mansour, H. Roquin, and P. Rouger, *Expression of CD11b (Leu15) antigen on CD3+, CD4+, CD8+, CD16+ peripheral lymphocytes. Estimation of CD3+8+11b+ and CD3+4-8-11b+ T-cell subsets using a single laser flow cytometer*. Scand J Immunol, 1992. **36**(3): p. 395-404.
35. Giorgi, J.V., M.A. Hausner, and L.E. Hultin, *Detailed immunophenotype of CD8+ memory cytotoxic T-lymphocytes (CTL) against HIV-1 with respect to expression of CD45RA/RO, CD62L and CD28 antigens*. Immunol Lett, 1999. **66**(1-3): p. 105-10.
36. Gorczyca, W., M.R. Melamed, and Z. Darzynkiewicz, *[Programmed death of cells (apoptosis)]*. Patol Pol, 1993. **44**(3): p. 113-9.
37. Griffith, T.S., T. Brunner, S.M. Fletcher, D.R. Green, and T.A. Ferguson, *Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege*. Science, 1995. **270**(5239): p. 1189-92.
38. Haas, R.J. and C. .Bender-Götze, *Leukämien im Kindesalter*. 1996, Tumorzentrum München.
39. Hackett, C.J. and H.B. Dickler, *Immunologic tolerance for immune system-mediated diseases*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **103**(3 Pt 1): p. 362-70.
40. Hamann, D., P.A. Baars, M.H. Rep, B. Hooibrink, S.R. Kerkhof-Garde, M.R. Klein, and R.A. van Lier, *Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells*. J Exp Med, 1997. **186**(9): p. 1407-18.
41. Hannet, I., F. Erkeller-Yuksel, P. Lydyard, V. Deneys, and M. DeBruyere, *Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations*. Immunol Today, 1992. **13**(6): p. 215, 218.

42. Hinz, M., P. Loser, S. Mathas, D. Krappmann, B. Dorken, and C. Scheidereit, *Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2798-807.
43. Hollenbaugh, D., J. Bajorath, R. Stenkamp, and A. Aruffo, *Interaction of P-selectin (CD62) and its cellular ligand: analysis of critical residues*. Biochemistry, 1993. **32**(12): p. 2960-6.
44. Hulstaert, F., I. Hannet, V. Deneys, V. Munhyeshuli, T. Reichert, M. De Bruyere, and K. Strauss, *Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. II. Varying kinetics of percentage and absolute count measurements*. Clin Immunol Immunopathol, 1994. **70**(2): p. 152-8.
45. Idriss, H.T. and J.H. Naismith, *TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)*. Microsc Res Tech, 2000. **50**(3): p. 184-95.
46. Ito, C., W.E. Evans, L. McNinch, E. Coustan-Smith, H. Mahmoud, C.H. Pui, and D. Campana, *Comparative cytotoxicity of dexamethasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia*. J Clin Oncol, 1996. **14**(8): p. 2370-6.
47. Itoh, N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto, and S. Nagata, *The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis*. Cell, 1991. **66**(2): p. 233-43.
48. Iwata, M., Y. Ohoka, T. Kuwata, and A. Asada, *Regulation of T cell apoptosis via T cell receptors and steroid receptors*. Stem Cells, 1996. **14**(6): p. 632-41.
49. Jain, J., C. Loh, and A. Rao, *Transcriptional regulation of the IL-2 gene*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(3): p. 333-42.
50. James-Yarish, M., W.G. Bradley, P.J. Emmanuel, R.A. Good, and N.K. Day, *Detection of cell specific cluster determinant expression by reverse transcriptase polymerase chain reaction*. J Immunol Methods, 1994. **169**(1): p. 73-82.
51. Janeway, C.A.j. and P. Travers, *Immunologie*. 1995, Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum Akad. Verlag.
52. Johnsen, A.C., J. Haux, B. Steinkjer, U. Nonstad, K. Egeberg, A. Sundan, A. Ashkenazi, and T. Espevik, *Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells-involvement in NK cell-mediated cytotoxicity*. Cytokine, 1999. **11**(9): p. 664-72.

53. June, C.H., J.A. Ledbetter, P.S. Linsley, and C.B. Thompson, *Role of the CD28 receptor in T-cell activation*. Immunol Today, 1990. **11**(6): p. 211-6.
54. Kalvelyte, A. and L. Pabrezaite, *Phenomena of spontaneous proliferation, differentiation, and apoptosis in primary culture of leukemic lymphocytes*. Exp Cell Res, 1994. **211**(2): p. 344-52.
55. Kam, C.M., D. Hudig, and J.C. Powers, *Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1477**(1-2): p. 307-23.
56. Kam, K.M., W.L. Leung, M.Y. Kwok, M.Y. Hung, S.S. Lee, and W.P. Mak, *Lymphocyte subpopulation reference ranges for monitoring human immunodeficiency virus-infected Chinese adults*. Clin Diagn Lab Immunol, 1996. **3**(3): p. 326-30.
57. Kansas, G.S., G.S. Wood, D.M. Fishwild, and E.G. Engleman, *Functional characterization of human T lymphocyte subsets distinguished by monoclonal anti-leu-8*. J Immunol, 1985. **134**(5): p. 2995-3002.
58. Kehry, M.R. and B.E. Castle, *Regulation of CD40 ligand expression and use of recombinant CD40 ligand for studying B cell growth and differentiation*. Semin Immunol, 1994. **6**(5): p. 287-94.
59. Kern, P.M., L. Keilholz, C. Forster, R. Hallmann, M. Herrmann, and M.H. Seegenschmiedt, *Low-dose radiotherapy selectively reduces adhesion of peripheral blood mononuclear cells to endothelium in vitro*. Radiother Oncol, 2000. **54**(3): p. 273-82.
60. Kersey, J.H., *Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia*. Blood, 1997. **90**(11): p. 4243-51.
61. Kneitz, C., M. Goller, M. Wilhelm, C. Mehringer, G. Wohlleben, A. Schimpl, and H.P. Tony, *Inhibition of T cell/B cell interaction by B-CLL cells*. Leukemia, 1999. **13**(1): p. 98-104.
62. Knoeber, L.L. and W. Clark, *Temporal requirement for antigen in primary and secondary MLC reactions*. Transplantation, 1977. **24**(1): p. 10-5.
63. Kornhuber, B., U. Ebener, E. Niegemann, and S. Wehner, *Minimal residual disease in leukemia in children*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **824**: p. 65-70.
64. Lederman, S., A.M. Cleary, M.J. Yellin, D.M. Frank, M. Karpusas, D.W. Thomas, and L. Chess, *The central role of the CD40-ligand and CD40 pathway*

- in T-lymphocyte-mediated differentiation of B lymphocytes*. Curr Opin Hematol, 1996. **3**(1): p. 77-86.
65. Lewis, D.E., D.S. Ng Tang, X. Wang, and C. Kozinetz, *Costimulatory pathways mediate monocyte-dependent lymphocyte apoptosis in HIV*. Clin Immunol, 1999. **90**(3): p. 302-12.
 66. Lim, L.C., M.N. Fiordalisi, J.L. Mantell, J.L. Schmitz, and J.D. Folds, *A whole-blood assay for qualitative and semiquantitative measurements of CD69 surface expression on CD4 and CD8 T lymphocytes using flow cytometry*. Clin Diagn Lab Immunol, 1998. **5**(3): p. 392-8.
 67. Lu, L., W. Li, C. Zhong, S. Qian, J.J. Fung, A.W. Thomson, and T.E. Starzl, *Increased apoptosis of immunoreactive host cells and augmented donor leukocyte chimerism, not sustained inhibition of B7 molecule expression are associated with prolonged cardiac allograft survival in mice preconditioned with immature donor dendritic cells plus anti-CD40L mAb*. Transplantation, 1999. **68**(6): p. 747-57.
 68. Lum, L.G., N. Orcutt-Thordarson, M.C. Seigneuret, and J.A. Hansen, *In vitro regulation of immunoglobulin synthesis by T-cell subpopulations defined by a new human T-cell antigen (9.3)*. Cell Immunol, 1982. **72**(1): p. 122-9.
 69. Makrynika, V., A. Kabral, and K.F. Bradstock, *Effects of recombinant human cytokines on precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells*. Exp Hematol, 1991. **19**(7): p. 674-9.
 70. Marzio, R., J. Mauel, and S. Betz-Corradin, *CD69 and regulation of the immune function*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1999. **21**(3): p. 565-82.
 71. McCarthy, N.J., C.A. Smith, and G.T. Williams, *Apoptosis in the development of the immune system: growth factors, clonal selection and bcl-2*. Cancer Metastasis Rev, 1992. **11**(2): p. 157-78.
 72. McCloskey, T.W., T. Cavaliere, S. Bakshi, R. Harper, J. Fagin, N. Kohn, and S. Pahwa, *Immunophenotyping of T lymphocytes by three-color flow cytometry in healthy newborns, children, and adults*. Clin Immunol Immunopathol, 1997. **84**(1): p. 46-55.
 73. McGahon, A.J., S.J. Martin, R.P. Bissonnette, A. Mahboubi, Y. Shi, R.J. Mogil, W.K. Nishioka, and D.R. Green, *The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro*. Methods Cell Biol, 1995. **46**: p. 153-85.

74. Montagna, D., M. Arico, E. Montini, F. De Benedetti, and R. Maccario, *Identification of HLA-unrestricted CD8+/CD28- cytotoxic T-cell clones specific for leukemic blasts in children with acute leukemia*. Cancer Res, 1995. **55**(17): p. 3835-9.
75. Moore, G.E., J.T. Grace, Jr., P. Citron, R. Gerner, and A. Burns, *Leukocyte cultures of patients with leukemia and lymphomas*. N Y State J Med, 1966. **66**(21): p. 2757-64.
76. Moore, K.L., N.L. Stults, S. Diaz, D.F. Smith, R.D. Cummings, A. Varki, and R.P. McEver, *Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells*. J Cell Biol, 1992. **118**(2): p. 445-56.
77. Mosley, R.L., D. Styre, and J.R. Klein, *Differentiation and functional maturation of bone marrow-derived intestinal epithelial T cells expressing membrane T cell receptor in athymic radiation chimeras*. J Immunol, 1990. **145**(5): p. 1369-75.
78. Munker, R., M. Lubbert, S. Yonehara, A. Tuchnitz, R. Mertelsmann, and W. Wilmanns, *Expression of the Fas antigen on primary human leukemia cells*. Ann Hematol, 1995. **70**(1): p. 15-7.
79. Nakajima, A., N. Watanabe, S. Yoshino, H. Yagita, K. Okumura, and M. Azuma, *Requirement of CD28-CD86 co-stimulation in the interaction between antigen-primed T helper type 2 and B cells*. Int Immunol, 1997. **9**(5): p. 637-44.
80. Nakajima-Iijima, S., H. Hamada, P. Reddy, and T. Kakunaga, *Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(18): p. 6133-7.
81. Neubert, R., I. Delgado, K. Abraham, C. Schuster, and H. Helge, *Evaluation of the age-dependent development of lymphocyte surface receptors in children*. Life Sci, 1998. **62**(12): p. 1099-110.
82. Nozawa, Y., E. Wachi, K. Tominaga, M. Abe, and H. Wakasa, *A novel monoclonal antibody (FUN-1) identifies an activation antigen in cells of the B-cell lineage and Reed-Sternberg cells*. J Pathol, 1993. **169**(3): p. 309-15.
83. Ohashi, Y., T. Takeshita, K. Nagata, S. Mori, and K. Sugamura, *Differential expression of the IL-2 receptor subunits, p55 and p75 on various populations of primary peripheral blood mononuclear cells*. J Immunol, 1989. **143**(11): p. 3548-55.
84. Orfao, A. and A. Ruiz-Arguelles, *General concepts about cell sorting techniques*. Clin Biochem, 1996. **29**(1): p. 5-9.

85. Oshimi, Y., S. Oda, Y. Honda, S. Nagata, and S. Miyazaki, *Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells*. J Immunol, 1996. **157**(7): p. 2909-15.
86. Osugi, Y., J. Hara, H. Kurahashi, N. Sakata, M. Inoue, K. Yumura-Yagi, K. Kawa-Ha, S. Okada, and A. Tawa, *Age-related changes in surface antigens on peripheral lymphocytes of healthy children*. Clin Exp Immunol, 1995. **100**(3): p. 543-8.
87. Peitsch, M.C., C. Muller, and J. Tschopp, *DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(18): p. 4206-9.
88. Peritt, D., D.A. Sesok-Pizzini, R. Schretzenmair, R.R. Macgregor, N.M. Valiante, X. Tu, G. Trinchieri, and M. Kamoun, *C1.7 antigen expression on CD8+ T cells is activation dependent: increased proportion of C1.7+CD8+ T cells in HIV-1-infected patients with progressing disease*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7563-8.
89. Pitti, R.M., S.A. Marsters, S. Ruppert, C.J. Donahue, A. Moore, and A. Ashkenazi, *Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12687-90.
90. Podack, E.R., *Killer lymphocytes and how they kill*. Curr Opin Cell Biol, 1989. **1**(5): p. 929-33.
91. Prosser, J.S., *Survival of human T and B lymphocytes after X-irradiation*. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 1976. **30**(5): p. 459-65.
92. Pui, C.H., *Childhood leukemias*. N Engl J Med, 1995. **332**(24): p. 1618-30.
93. Rabbitts, T.H., *Chromosomal translocations in human cancer*. Nature, 1994. **372**(6502): p. 143-9.
94. Rella, W., H. Winterleitner, and W. Knapp, *MLC-activation by acute lymphatic leukemia blasts*. Blut, 1979. **39**(1): p. 17-25.
95. Renno, T., M. Hahne, and H.R. MacDonald, *Proliferation is a prerequisite for bacterial superantigen-induced T cell apoptosis in vivo*. J Exp Med, 1995. **181**(6): p. 2283-7.
96. Schattner, E. and S.M. Friedman, *Fas expression and apoptosis in human B cells*. Immunol Res, 1996. **15**(3): p. 246-57.
97. Schattner, E.J., J. Mascarenhas, I. Reyfman, M. Koshy, C. Woo, S.M. Friedman, and M.K. Crow, *Chronic lymphocytic leukemia B cells can express*

- CD40 ligand and demonstrate T-cell type costimulatory capacity.* Blood, 1998. **91**(8): p. 2689-97.
98. Schuler, D. and B. Szende, *Apoptosis and acute lymphocytic leukemia in children.* Ann N Y Acad Sci, 1997. **824**: p. 28-37.
 99. Sedgwick, J.D., D.S. Riminton, J.G. Cyster, and H. Korner, *Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement.* Immunol Today, 2000. **21**(3): p. 110-3.
 100. Shigehara, K., N. Shijubo, F. Nakanishi, M. Hirasawa, M. Inuzuka, M. Ohmichi, Y. Hiraga, and S. Abe, *Circulating gamma delta-T-cell-receptor-positive lymphocytes in sarcoidosis.* Respiration, 1995. **62**(2): p. 84-8.
 101. Shresta, S., C.T. Pham, D.A. Thomas, T.A. Graubert, and T.J. Ley, *How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?* Curr Opin Immunol, 1998. **10**(5): p. 581-7.
 102. Stamenkovic, I., E.A. Clark, and B. Seed, *A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas.* Embo J, 1989. **8**(5): p. 1403-10.
 103. Stryer, L., *Biochemie.* Vol. 4.Auflage. 1996, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
 104. Takahashi, T., M. Tanaka, J. Inazawa, T. Abe, T. Suda, and S. Nagata, *Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity.* Int Immunol, 1994. **6**(10): p. 1567-74.
 105. Taniguchi, T., H. Matsui, T. Fujita, C. Takaoka, N. Kashima, R. Yoshimoto, and J. Hamuro, *Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2.* Nature, 1983. **302**(5906): p. 305-10.
 106. Touw, I. and B. Lowenberg, *Interleukin 2 stimulates chronic lymphocytic leukemia colony formation in vitro.* Blood, 1985. **66**(1): p. 237-40.
 107. Uckun, F.M. and A. Frankel, *The current status of immunotoxins: an overview of experimental and clinical studies as presented at the Third International Symposium on Immunotoxins.* Leukemia, 1993. **7**(2): p. 341-8.
 108. van Emmerik, N.E., C.J. Knoop, L.M. Vaessen, A.H. Balk, B. Mochtar, F.H. Claas, and W. Weimar, *C1.7 monoclonal antibody designates high-avidity CD4+ cytotoxic T lymphocytes involved in clinical heart rejection.* Transplantation, 1998. **66**(1): p. 135-8.

109. Vazquez, A., M.T. Auffredou, N. Chaouchi, J. Taieb, S. Sharma, P. Galanaud, and G. Leca, *Differential inhibition of interleukin 2- and interleukin 4-mediated human B cell proliferation by ionomycin: a possible regulatory role for apoptosis*. Eur J Immunol, 1991. **21**(10): p. 2311-6.
110. Vermes, I., C. Haanen, D.J. Richel, M.R. Schaafsma, E. Kalsbeek-Batenburg, and C.P. Reutelingsperger, *Apoptosis and secondary necrosis of lymphocytes in culture*. Acta Haematol, 1997. **98**(1): p. 8-13.
111. Walchner, M. and M. Wick, *Elevation of CD8+ CD11b+ Leu-8- T cells is associated with the humoral immunodeficiency in myeloma patients*. Clin Exp Immunol, 1997. **109**(2): p. 310-6.
112. Walker, L.S., J.D. McLeod, G. Boulougouris, Y.I. Patel, N.D. Hall, and D.M. Sansom, *Down-regulation of CD28 via Fas (CD95): influence of CD28 on T-cell apoptosis*. Immunology, 1998. **94**(1): p. 41-7.
113. Wang, R., T.L. Ciardelli, and J.H. Russell, *Partial signaling by cytokines: cytokine regulation of cell cycle and Fas-dependent, activation-induced death in CD4+ subsets*. Cell Immunol, 1997. **182**(2): p. 152-60.
114. Weber, E., D. Schmitter, H. Resch, J.A. Zarn, R. Waibel, M. Mabry, P. Huguenin, and R.A. Stahel, *Radiation studies on B cell differentiation marker CD24/SCLC Cluster-4 antigen expressing and non-expressing lung cancer cell lines and mouse fibroblasts*. Int J Radiat Biol, 1995. **68**(2): p. 205-13.
115. Williams, G.T. and C.A. Smith, *Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death*. Cell, 1993. **74**(5): p. 777-9.
116. Williams, G.T., C.A. Smith, E. Spooncer, T.M. Dexter, and D.R. Taylor, *Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis*. Nature, 1990. **343**(6253): p. 76-9.
117. Wills, M.R., A.J. Carmichael, M.P. Weekes, K. Mynard, G. Okecha, R. Hicks, and J.G. Sissons, *Human virus-specific CD8+ CTL clones revert from CD45RO^{high} to CD45RA^{high} in vivo: CD45RA^{high}CD8+ T cells comprise both naive and memory cells*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7080-7.
118. Wilson, D.B., *Quantitative studies on the mixed lymphocyte interaction in rats. I. Conditions and parameters of response*. J Exp Med, 1967. **126**(4): p. 625-54.
119. Wormann, B., T.G. Gesner, R.A. Mufson, and T.W. LeBien, *Proliferative effect of interleukin-3 on normal and leukemic human B cell precursors*. Leukemia, 1989. **3**(6): p. 399-404.

120. Xu, Y., C.L. Greenstock, A. Trivedi, and R.E. Mitchel, *Occupational levels of radiation exposure induce surface expression of interleukin-2 receptors in stimulated human peripheral blood lymphocytes*. Radiat Environ Biophys, 1996. **35**(2): p. 89-93.
121. Zambello, R., L. Trentin, A. Cerutti, C. Enthammer, A. Milani, T. Franceschi, C. Messina, G.L. Cetto, C. Agostini, and G. Semenzato, *Independent expression of p55 and p75 interleukin-2 receptors (IL-2R) during intravenous or subcutaneous administration of recombinant interleukin-2 (rIL-2) by T-lymphocytes and natural killer cells*. Cancer, 1994. **74**(9): p. 2562-9.